

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Направление подготовки: *Химия, физика и механика материалов*

Образовательная программа: *Химия, физика и механика материалов*

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

*Синтез, идентификация, физико-химические свойства и биологическая
активность производных легких фуллеренов с L-треонином*

Студент 2 курса

Бушманова Елена Леонидовна

Уровень/ступень образования:

Магистратура

Научные руководители:

д.х.н., доцент кафедры химии

твёрдого тела

Семенов Константин Николаевич,

д.б.н., в.н.с. межкафедральной

лаборатории биомедицинской химии

Шаройко Владимир Владимирович

Санкт-Петербург

2017 год

Содержание

Введение	6
1 Обзор литературы	8
1.1 Первые данные о структуре и синтезе фуллеренов	8
1.2 Строение фуллеренов C_{60} и C_{70}	9
1.2.1 Особенности структуры фуллеренов и правило изолированных пентагонов	9
1.2.2 Особенности структуры фуллерена C_{60}	11
1.2.3 Особенности структуры фуллерена C_{70}	12
1.3 Методы синтеза фуллеренов	14
1.3.1 Плазменные методы	14
1.3.2 Омическое электрическое нагревание	15
1.3.3 Индуктивное испарение графита	16
1.3.4 Коронный разряд	16
1.3.5 Испарение графита под воздействием пучка электронов	16
1.3.6 Крекинг углеводородов	16
1.4 Методы выделения и разделения фуллеренов	16
1.4.1 Разделение, основанное на различной политермической растворимости фуллеренов C_{60} и C_{70}	17
1.4.2 Разделение фуллеренов методом сублимации	17
1.4.3 Экстракция фуллеренов из сажи	18
1.4.4 Хроматографический метод разделения фуллеренов	18
1.5 Модели сборки фуллеренов	18
1.6 Типы производных фуллеренов	21
1.6.1 Эндоздральные производные фуллеренов	21
1.6.2 Экзоэдральные производные фуллеренов	22
1.7 Общие сведения об аминокислотах	23
1.8 Строение аминокислоты треонина	25
1.9 Биосинтез треонина	26
1.10 Катаболизм треонина	28

1.11 Биологическая активность легких фуллеренов и их производных	29
1.11.1 Взаимосвязь размеров и формы молекул легких фуллеренов с их биологической активностью.....	30
1.11.2 Особенности химических свойств легких фуллеренов, обуславливающие их биологическую активность.....	31
1.11.3 Фотофизические свойства легких фуллеренов.....	32
1.11.4 Липофильность легких фуллеренов	33
1.12 Водорастворимые производные фуллеренов и их биологическая активность	34
1.12.1 Фуллеренолы.....	34
1.12.2 Карбоксилированные производные фуллеренов.....	37
1.12.3 Производные фуллеренов с аминокислотами	38
2 Экспериментальная часть	41
2.1 Синтез производных легких фуллеренов с L-треонином.....	41
2.2 Идентификация производных легких фуллеренов с L-треонином	42
2.3. Исследование свойств производных легких фуллеренов с L-треонином	44
2.3.1 Объемные свойства водных растворов производных легких фуллеренов с L-треонином при 25 °С	44
2.3.2 Удельная и молярная рефракции водных растворов производных легких фуллеренов с L-треонином.....	45
2.3.3 Политермическая растворимость производных легких фуллеренов с L-треонином в воде и температурная зависимость плотности насыщенных растворов	46
2.3.4 Изучение концентрационной зависимости электропроводности водных растворов производных легких фуллеренов с L-треонином. Расчет кажущейся степени диссоциации, концентрационных и термодинамической констант диссоциации.....	46
2.3.5 Определение размеров ассоциатов производных легких фуллеренов с L-треонином в воде методом динамического светорассеяния	47

2.3.6 Исследование поверхностных явлений в водных растворах производного легкого фуллерена C_{70} с L-треонином.....	48
2.4 Исследование биологической активности производных легких фуллеренов с L-треонином.....	49
2.4.1 Изучение влияния производных легких фуллеренов с L - треонином на физиолого-биохимические характеристики клеток человека.....	49
2.4.2 Изучение влияния производного легкого фуллерена C_{60} с L - треонином на физиолого-биохимические характеристики растений.....	51
3 Обсуждение результатов	55
3.1 Идентификация производных легких фуллеренов с L-треонином	55
3.2 Исследование свойств производных легких фуллеренов с L-треонином	61
3.2.1 Объемные свойства водных растворов производных легких фуллеренов с L-треонином при 25 °С	61
3.2.2 Удельная и молярная рефракции водных растворов производных легких фуллеренов с L-треонином	63
3.2.3 Политермическая растворимость производных легких фуллеренов с L-треонином в воде и температурная зависимость плотности насыщенных растворов	65
3.2.4 Изучение концентрационной зависимости электропроводности водных растворов производных легких фуллеренов с L-треонином. Расчет кажущейся степени диссоциации, концентрационных и термодинамической констант диссоциации.....	66
3.2.5 Определение размеров ассоциатов производных легких фуллеренов с L-треонином в воде методом динамического светорассеяния	67
3.2.6 Исследование поверхностных явлений в водных растворах производного легкого фуллерена C_{70} с L-треонином.....	69
3.2.7 Изучение цитотоксичности и противоопухолевой активности производных легких фуллеренов с L - треонином на примере C_{60} -L-треонина.....	72
3.2.8 Изучение влияния производного C_{60} с L-треонином на гемолиз эритроцитов крови человека спектрофотометрическим методом	74

3.2.9 Влияние производного фуллерена C ₆₀ с L-треонином на качественные характеристики семян <i>Lepidium sativum</i> (кресс-салат; с. «Ажур»).....	75
3.2.10 Влияние производного фуллерена C ₆₀ с L-треонином на показатели физиологического состояния и нетто-продуктивности <i>Hordeum vulgare</i> (яровой ячмень; с. Ленинградский)	75
3.2.11 Изучение влияния производного фуллерена C ₆₀ с L – треонином на работу антиоксидантной системы <i>Hordeum vulgare</i> (яровой ячмень; с. Ленинградский).....	76
Результаты и выводы	80
Благодарности.....	82
Список цитированной литературы	83

Введение

Важным направлением исследований в современном материаловедении является изучение углеродсодержащих материалов, среди которых фуллерены занимают одно из первых мест. При этом одними из самых активно развивающихся и многообещающих областей их возможного применения становятся биология и медицина.

Благодаря своему электронному строению, размеру молекул, липофильности и физико-химическим свойствам фуллерены, в частности легкие фуллерены (C_{60} и C_{70}), могут рассматриваться в качестве основы для синтеза биологически активных веществ. Однако их применение для решения конкретных практических задач зачастую оказывается затруднительным в связи с ограниченной растворимостью C_{60} и C_{70} в воде и водных растворах.

В свою очередь, водорастворимые производные легких фуллеренов могут обладать уникальной биологической активностью и найти применение в качестве соединений-прототипов (lead compound) противораковых, нейропротекторных, противовирусных препаратов, обладать антиоксидантной и антибактериальной активностью (рис.1).

В связи с этим, разработка методов функционализации фуллеренового ко́ра, изучение структуры и свойств полученных соединений являются актуальными задачами в области органической, физической и биомедицинской химии.

Целью данной работы является синтез и идентификация производных легких фуллеренов с L-треонином, а также изучение физико-химических свойств и биологической активности полученных соединений. Достижение этой цели предполагает решение следующих задач:

- а) разработка методики синтеза производных фуллеренов C_{60} и C_{70} с L-треонином;
- б) идентификация полученных образцов методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), ИК- и УФ-спектроскопии, элементного анализа, термогравиметрии, масс-спектрометрии;
- с) изучение физико-химических свойств и фазовых равновесий в системе, содержащей производные легких фуллеренов с L-треонином, методами кондуктометрии, рефрактометрии, пикнометрии, изотермического насыщения,

динамического рассеяния света, пластинки Вильгельми, микроскопии под углом Брюстера, атомно-силовой микроскопии;

d) изучение цитотоксичности полученных соединений на клеточной линии эпителия человека (*HEK293*) и на опухолевых клетках человека спектрофотометрическим методом с использованием тетразолиевого красителя (МТТ-тест);

е) изучение влияния производных легких фуллеренов с L-треонином на гемолиз эритроцитов крови человека спектрофотометрическим методом;

ф) исследование влияния производного фуллерена C_{60} с L-треонином на качественные характеристики семян, нетто-продуктивность и работу антиоксидантной системы растений.

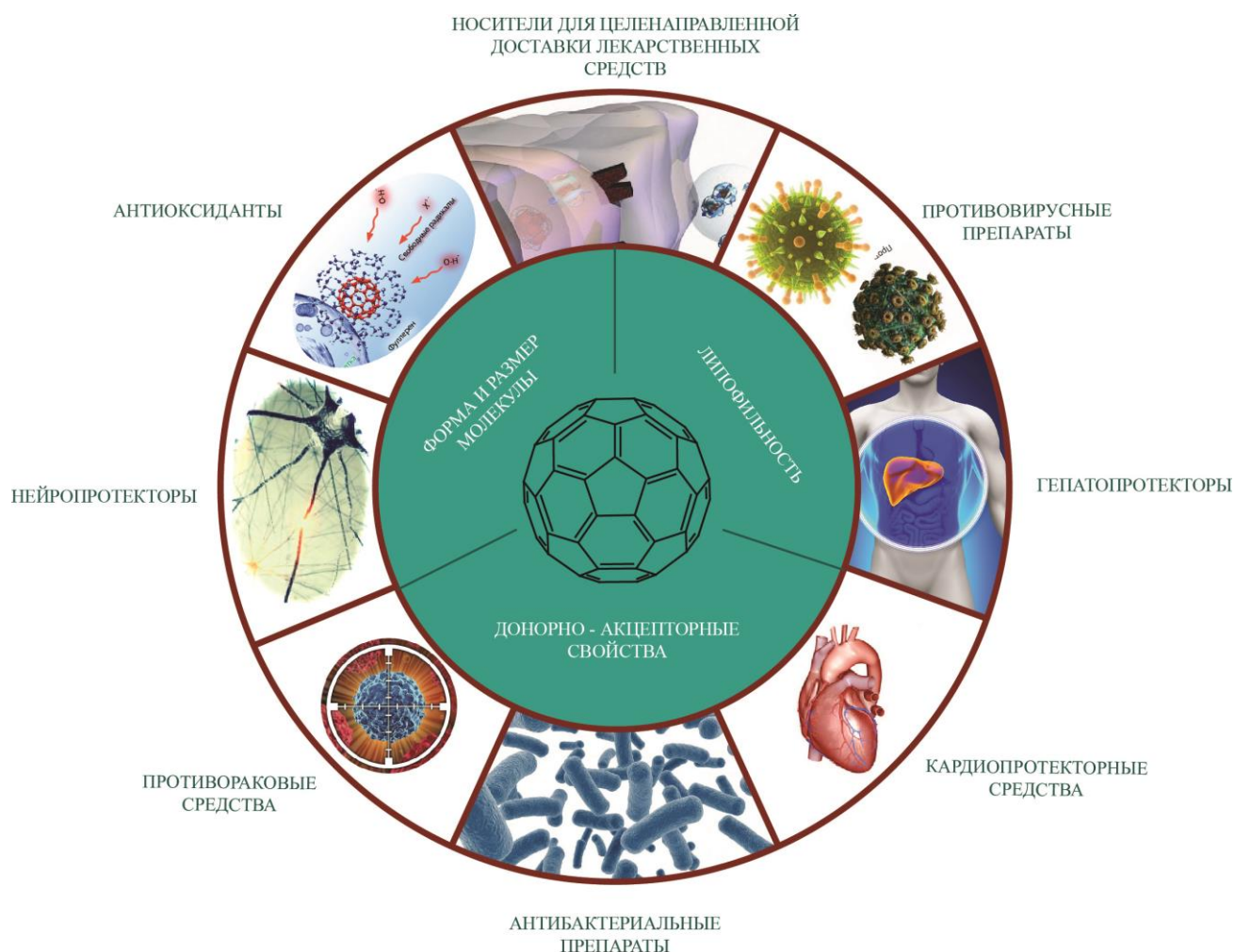


Рис.1. Возможные области применения фуллеренов и их водорастворимых производных

1 Обзор литературы

1.1 Первые данные о структуре и синтезе фуллеренов

Открытию фуллеренов предшествовали гипотезы о возможности их существования. В 1966 г. Д. Джонс предположил, что введение пятиугольных дефектов в графитовый слой из правильных шестиугольников смогло бы привести к образованию соответствующей замкнутой полый структуры [1]. После сообщения о синтезе корануллена [2], в 1970 г. Осава впервые выдвинул гипотезу о стабильности молекулы C_{60} , обладающей формой, подобной футбольному мячу (рис.2) [3,4]. Позже устойчивость этой молекулы была доказана квантохимическими расчетами по методу Хюккеля [5-7].

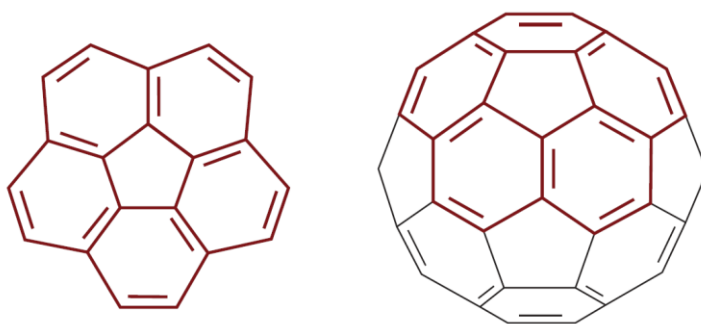


Рис.2. Корануллен (слева), фуллерен C_{60} (справа)

В 1984 г. Ролфинг, Кокс и Калдер обнаружили, что при лазерном испарении графита в вакууме можно получить углеродные кластеры C_n , содержащие от 1 до 190 атомов [8]. При этом было получено отчетливое бимодальное распределение кластеров по размерам: 1) кластеры с четным и нечетным количеством атомов при $1 \leq n \leq 30$; 2) кластеры только с четным количеством атомов при $20 \leq n \leq 90$.

Открытие фуллеренов произошло в 1985 г. благодаря группе исследователей: Гарольд У. Крото, Джеймс. Р. Хит, Шон К. О'Брайен, Роберт Ф. Керл и Ричард Э. Смолли, занимающихся изучением условий образования кластеров углерода при облучении лазером поверхности графита [9]. Им удалось обнаружить, что при определенных условиях кластерообразования можно получить масс-спектр продуктов, в котором присутствуют пик иона с $m/z=720$ и, меньший по интенсивности, пик иона с $m/z=840$. Было предположено и позже подтверждено, что эти пики соответствуют молекулам C_{60} и C_{70} , структуры которых имеют форму усеченного икосаэдра (симметрия I_h) и форму эллипсоидного типа (симметрия D_{5h}),

соответственно. За это открытие Г. Крото, Р. Смолли и Р. Керл, стали лауреатами Нобелевской премии 1996 г.

Впервые детектированные молекулы были названы фуллеренами из-за схожести со структурой «геодезического купола», использующейся во многих работах американского архитектора Бакминстера Фуллера (1895-1983 гг.).

1.2 Строение фуллеренов C_{60} и C_{70}

1.2.1 Особенности структуры фуллеренов и правило изолированных пентагонов

Фуллерены представляют собой новую аллотропную модификацию углерода, в которой атомы образуют полиэдры, образованные пяти- и шестичленными циклами (пентагонами и гексагонами). Минимальным элементом структуры фуллерена является молекула, а не периодическая решетка атомов как в случае графита или алмаза.

Известно, что существуют фуллерены, обладающие и другими структурными элементами. Так, например, были экспериментально получены фуллерен C_{62} , содержащий четырехчленный цикл (тетрагон) [10] и фуллерен C_{68} , содержащий семичленный цикл (гептагон) [11].

Строение молекул фуллеренов полностью отвечает теореме Л. Эйлера, по которой можно определить число многоугольников, требующихся для построения замкнутых поверхностей. Она утверждает правильность следующего соотношения, связывающего количество вершин V , граней F и ребер E в полиэдре:

$$F - E + V = 2 \quad (1)$$

Так как большинство фуллеренов состоят из пентагонов и гексагонов, то для них верны и следующие равенства:

$$\begin{aligned} F &= P + H; \\ E &= \frac{5P + 6H}{2}; \\ V &= \frac{5P + 6H}{3}; \end{aligned} \quad (2)$$

где P и H – количество пятиугольных и шестиугольных граней, соответственно.

Тогда путем подстановки (2) в (1) легко найти, что для образования замкнутой поверхности необходимо 12 пятиугольных граней и произвольное количество шестиугольных. Количество гексагонов для построения молекулы фуллерена можно найти по формуле:

$$H = \frac{V}{2} - 10 \quad (3)$$

Таким образом, в связи с множеством вариантов взаиморасположения 12 пятичленных циклов и H шестичленных в молекуле фуллерена, возможно существование большого числа изомеров. Например, для фуллерена C_{60} , образованного 12 пентагонами и 20 гексагонами, известно 1812 топологических изомеров [12]. Однако стабильным из них является только один, удовлетворяющий правилу изолированных пентагонов. Согласно этому правилу, фуллерены, в которых нет смежных пентагонов, являются наиболее стабильными; а структуры, подобные пенталену (в которых пентагоны имеют общую связь) нестабильны [4,9,13]. При этом соответствие определенного фуллерена этому правилу указывает только на его большую стабильность по сравнению с другими изомерами, а не утверждает возможность его практического синтеза.

Большинство синтезированных и выделенных фуллеренов удовлетворяет правилу изолированных пентагонов, но также существуют работы, подтверждающие возможность существования стабильных производных фуллеренов, не подчиняющихся этому правилу [14-17].

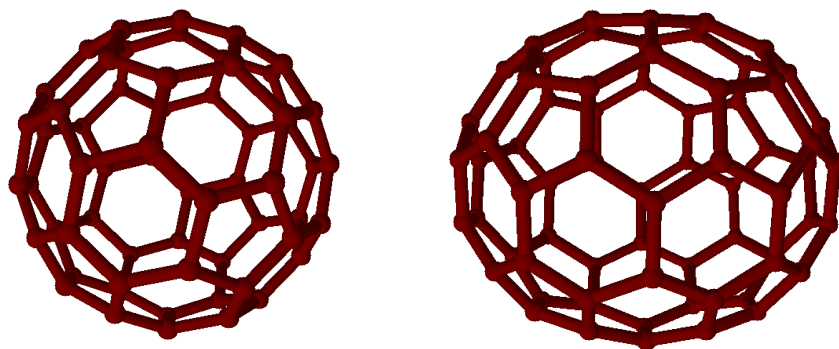


Рис. 3. Строение молекул фуллеренов C_{60} (слева) и C_{70} (справа).

Фуллерены C_{60} (изомер с симметрией I_h) и C_{70} (изомер с симметрией D_{5h}) отвечают правилу изолированных пентагонов (рис. 3), являются наиболее стабильными и, как следствие, более распространенными и изученными.

1.2.2 Особенности структуры фуллерена C_{60}

Молекула изомера фуллерена C_{60} с симметрией I_h имеет структуру правильного усеченного икосаэдра, где углеродные атомы находятся в вершинах 12 пятичленных и 20 шестичленных циклов. При этом каждый гексагон граничит с тремя гексагонами и тремя пентагонами, а каждый пентагон окружен только гексагонами (рис. 2).

Структура фуллерена C_{60} была впервые подтверждена спектром ЯМР ^{13}C , состоящим из одного синглета [18]. В этой молекуле все атомы углерода эквивалентны (т.е. переводятся друг в друга операциями симметрии молекулы), а также наблюдается распределение связей двух типов: 1) связь 6-6 на границе двух гексагонов; 2) связь 6-5 на границе гексагона и пентагона. Связи 6-6 значительно короче 6-5 связей, их длины составляют 1.369-1.406 Å и 1.43-1.467 Å, соответственно [19] (таблица 1). Таким образом, в гексагонах имеет место альтернирование двойных (6-6) и одинарных (6-5) связей, а в пентагонах присутствуют только одинарные связи (6-5).

Валентные углы в молекуле C_{60} для пентагонов имеют значение 108° , а для гексагонов — 120° . Следовательно, сферический эксцесс ϕ , определяемый как дополнение суммы трёх валентных углов при данном атоме до 360° , равен 12° для всех углеродных атомов.

Таким образом, стабильность фуллерена C_{60} определяется высокой симметрией молекулы (а значит, равномерным распределением напряжения по молекуле), а также планарностью пентагонов и гексагонов.

Таблица 1. Значения длин связей (Å) в молекуле фуллерена C_{60} , полученные экспериментальными и расчетными методами [19]

Методы		Длина [6-6] - связи	Длина [6-5] - связи
Эсп.	ЯМР	1.370	1.448
	Нейтроннография	1.391	1.444

Эксп.	Газовая электронография	1.401	1.458
	Рентгеноструктурный анализ	1.355	1.467
Расчетные	HF (STO-3G)	1.376	1.465
	HF (7s3p/4s2p)	1.369	1.453
	LDF (11s6p)	1.390	1.430
	HF (tzp)	1.370	1.448
	MP2	1.406	1.446

1.2.3 Особенности структуры фуллерена C_{70}

Фуллерен C_{70} , следующий по распространенности среди фуллеренов, состоит из 12 пентагонов, 25 гексагонов и имеет эллипсоидальную форму.

Спектр ^{13}C ядерного магнитного резонанса (ЯМР) фуллерена C_{70} [20] состоит из пяти пиков, что указывает на существование пяти эквивалентных друг другу групп атомов. При этом интенсивности пиков имеют соотношение 10:20:10:20:10, указывая на количество углеродных атомов в каждой группе. Таким образом, было установлено, что молекуле фуллерена C_{70} соответствует симметрия D_{5h} .

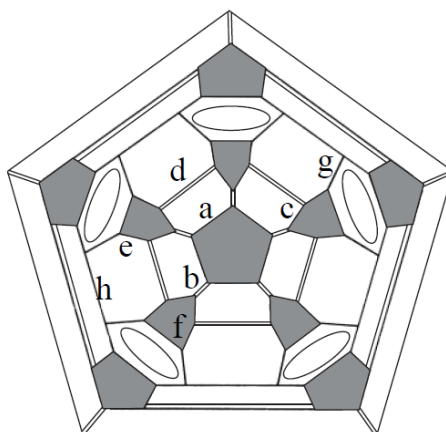


Рис. 4. Диаграмма Шлегеля фуллерена C_{70} [19, с изменениями].

В молекуле C_{70} присутствует восемь различных типов связей (рис. 4): помимо одинарных и двойных, в пяти гексагонах экваториального пояса реализуется

Таблица 2. Значения длин связей (Å) в молекуле фуллерена C₇₀, полученные экспериментальными и расчетными методами [21].

Метод		Связь							
		a	b	c	d	e	f	g	h
Экспериментальный	Газовая электронография	1,461	1,388	1,453	1,386	1,468	1,425	1,405	1,531
	Твердотельная электронография	1,464	1,370	1,470	1,370	1,460	1,470	1,390	1,410
	Нейтронोगрафия	1,460	1,382	1,449	1,396	1,464	1,420	1,415	1,477
	Рентгеноструктурный анализ	1,458	1,380	1,459	1,370	1,460	1,430	1,407	1,476
Расчетный	HF/dzp	1,451	1,375	1,446	1,361	1,457	1,415	1,407	1,475
	BP86/tzp	1,454	1,401	1,450	1,395	1,449	1,441	1,424	1,471

делокализация - связей [19], что согласуется и с расчетными, и с экспериментальными данными [21] (Таблица 2).

Также было установлено [22], что в фуллерене C_{70} , в отличие от фуллерена C_{60} наблюдаются искажения циклов. Наиболее сильные деформации (значения двугранных углов достигают 13°) наблюдаются в гексагонах с делокализованной - связью, а в пентагонах и гексагонах с альтернированием двойных и одинарных связей эта деформация мала ($\sim 1^\circ$ и $\sim 5^\circ$, соответственно). То есть сферический эксцесс максимален для атомов, расположенных на полюсах молекулы, и минимален для экваториальных (ϕ тем больше, чем меньше кривизна поверхности).

Таким образом, стабильность фуллерена C_{70} связана с относительно равномерным распределением напряжения по молекуле и небольшим отклонением в планарности пентагонов и гексагонов с альтернированием связей.

1.3 Методы синтеза фуллеренов

Метод, благодаря которому были открыты фуллерены, не позволял получать их в препаративных количествах. Решением этой проблемы стал метод, предложенный в 1990 г. Кречмером, Лэмом, Фостиропулосом и Хаффманом [23]. Он заключался в получении углеродной «сажи» путем сжигания графитовых электродов в электрической дуге в атмосфере гелия при уменьшенном давлении. Содержание фуллеренов в «саже» было выявлено спектроскопически, а несколько позже их удалось извлечь оттуда путем экстракции бензолом или толуолом.

1.3.1 Плазменные методы

Одним из наиболее популярных из семейства плазменных методов остается получение фуллеренов в дуговом разряде (ARC synthesis). Синтез осуществляется при давлении 150-500 торр [24] в атмосфере инертного газа. Предпочтительно используют бесконтактный способ получения дуги, то есть после зажигания дуги поддерживают электроды на фиксированном расстоянии друг от друга (дуга горит в зазоре между ними).

Когда дуга питается постоянным током, испаряется в основном анодный электрод. Углеродный пар уносится из зоны горения дуги и затем конденсируется на поверхности специальной охлаждаемой камеры. В зоне дуги обеспечивают поток буферного газа, иначе унос пара будет происходить только за счет конвективных

потоков. В таком случае значительная часть углеродного пара будет конденсироваться на катоде, что приведет к уменьшению выхода фуллеренов [25].

Буферный газ также необходим для гашения энергии атомов углерода и растущего углеродного кластера, что считается необходимым условием синтеза, так как атомы углерода в дуге имеют высокую энергию, препятствующую образованию стабильных кластеров. Процесс сборки молекулы фуллерена из углеродных фрагментов также протекает с выделением энергии. Установлено, что наиболее подходящим буферным газом является гелий, так как его атомы легкие и обладают при этом высокой эффективностью тушения колебаний возбужденных молекул.

По данным литературы, содержание фуллеренов в продуктах дугового синтеза может варьировать в интервале от долей процента до нескольких десятков процентов. Получаемая углеродная «сажа» содержит смесь фуллеренов C_{60} (приблизительно на 90%) и C_{70} (приблизительно 10%), а также незначительное количество высших фуллеренов [25].

Еще один плазменный метод синтеза фуллеренов связан с использованием индукционной плазмы. Плазма этого типа является безэлектродной, т.к. она возбуждается и поддерживается переменным магнитным полем, создаваемым в камере, генерирующей плазму, при помощи индукционной катушки-индуктора. В такую камеру, поддерживаемую при давлении 0.01 Торр, вводят газы, содержащие атомы углерода (например, спирты и углеводороды). Полученная плазма содержит C_2 -радикалы и охлаждается газами, такими как Ar, He, N_2 или H_2 . Сажа, содержащая фуллерены, накапливается на стенках плазменной камеры [26, 27].

Также, для получения фуллеренов используют углеродсодержащие соединения типа CS_2 , которые нагревают в горячей плазме для разложения перед термостойкой пластиной-экраном, охлаждаемой для сбора твердых продуктов и выделения фуллеренов [28].

1.3.2 Омическое электрическое нагревание

Данный метод синтеза подразумевает нагрев углерода или графита в прозрачной камере, при заданном давлении инертного газа (например, 200 Торр) омическим электрическим нагреванием и концентрированным солнечным излучением до поверхностных температур 3000-4000°C. После этого фуллерены собирают со стенок камеры или извлекают из инертного газа [29].

1.3.3 Индуктивное испарение графита

Еще одним методом синтеза фуллеренов является индукционное испарение образца углерода, находящегося на подложке из нитрида бора. Синтез проводится в атмосфере гелия при температуре около 2700 °С. В процессе эксперимента возгонка 1 г графита протекает в течение 10 минут, а из полученной сажи можно выделить до 120 мг фуллеренового экстракта [30].

1.3.4 Коронный разряд

Процесс заключается во введении газовой смеси, содержащей 30-60% CO, в реакционный сосуд и в установлении коронного разряда в сосуде. Аппарат содержит один или более графитовых электродов, которые могут быть нагреты добела [31].

1.3.5 Испарение графита под воздействием пучка электронов

Данный метод является способом получения фуллереновой сажи, содержащей значительное количество высших фуллеренов. Основным продуктом синтеза является фуллерен C₇₀, тогда как C₆₀ присутствует в экстракте фуллеренов в качестве примеси. Также в ее состав входят фуллерены C₇₆, C₇₈, C₈₂ и C₈₄ [30, 32].

1.3.6 Крекинг углеводородов

Фуллерены также получают путем сжигания углеродсодержащих веществ (например, C₆H₆ и C₂H₂). При оптимальных условиях синтеза выход фуллеренового экстракта достигает 3 г на 1 кг углерода, содержащегося в исходном веществе. Особенностью метода является высокое содержание фуллерена C₇₀. Соотношение C₇₀/C₆₀ в экстракте составляет 0,26-5,7 [33].

Также фуллерены получают пиролизом нафталина при температуре около 1000°C в струе аргона [34]. Основными продуктами пиролиза являются полинафталины, содержащие до семи нафталиновых фрагментов. При этом фуллерены C₆₀ и C₇₀ образуются как побочные продукты с выходом менее 0,5%. Также среди продуктов синтеза обнаруживаются производные фуллеренов, в частности C₆₀H₃₆ [30].

1.4 Методы выделения и разделения фуллеренов

Все способы синтеза фуллеренов подразумевают получение смеси, которая может содержать углеродную сажу, фуллерены различного состава, частицы графита, полиароматические углеводороды и.т.д. Существует несколько способов выделения и разделения фуллеренов.

1.4.1 Разделение, основанное на различной политермической растворимости фуллеренов C_{60} и C_{70}

Данный метод основан на различной растворимости фуллеренов C_{60} и C_{70} в органическом растворителе (например, о-ксилоле) в зависимости от температуры. Например, известен способ [35] разделения фуллеренов с получением двух продуктов: 1) иобогатенного по фуллерену C_{60} (концентрат C_{60}); 2) обогащенного по фуллерену C_{70} (концентрат C_{70}). Помимо легких фуллеренов, продукты также содержат тяжелые фуллерены C_{76} , C_{78} , C_{84} .

Концентрат C_{60} , содержащий 80-92% соответствующего фуллерена, получают при температуре 70-90°C. А концентрат C_{70} с содержанием 80-97% фуллерена C_{70} - при температуре (-15)÷(-25)°C.

Рассматриваемый метод используется для предхроматографического разделения смеси фуллеренов. При последующих очистках концентратов можно извлекать как легкие, так и тяжелые фуллерены в отдельные фракции.

1.4.2 Разделение фуллеренов методом сублимации

Фуллерены можно выделить из их смеси путем сублимации в вакууме [36]. Согласно этому методу, при испарении графита электродуговым способом в зону испарения подается поток гелия, который переносит пары фуллеренов и частицы сажи в зону конденсации. Однако такой процесс также предполагает перенос сажи потоком газа из зоны конденсации и загрязнение этой сажей зоны конденсации фуллеренов. При этом использование пылеудерживающих фильтров усложняет конструкцию установки.

Для решения этой проблемы было предложено предварительно добавлять в конденсат растворитель при перемешивании до образования пасты [37]. В качестве растворителя могут быть использованы бензол, ксилол или вода с добавкой небольшого количества водорастворимой органической жидкости, например, спирта. Сублимацию фуллеренов производят при температуре от 580 до 800 °C в вакууме. При использовании компактной сажи пылепереноса из зоны нахождения сажи в зону конденсации фуллеренов не происходит.

Метод основывается на различии в теплотах и температурах сублимации фуллеренов C_{60} и C_{70} (порядка 3-5 кДж/моль по данным разных авторов и порядка 10°C). При этом их температурные зависимости парциальных давлений паров

достаточно различимы, что дает возможность их разделения рассматриваемым способом. Данный метод может быть использован только для предварительной очистки и разделения C_{60} и C_{70} [38].

1.4.3 Экстракция фуллеренов из сажи

Экстракция фуллеренов из сажи в виде раствора в органическом растворителе является наиболее распространенным способом извлечения фуллеренов из углеродного конденсата. Растворители, которые используют для выделения фуллеренов, должны хорошо растворять фуллерены и обладать как можно более низкой температурой кипения. Чаще всего для выделения фуллеренов используют бензол, толуол, о-ксилол [39]. Экстракцию обычно проводят в аппарате Сокслета, при этом выход фуллеренового экстракта существенно зависит от продолжительности процесса.

1.4.4 Хроматографический метод разделения фуллеренов

Использование данного метода предполагает элюирование смеси фуллеренов органическим растворителем в хроматографической колонке. В качестве сорбента в колонке может использоваться оксид алюминия [40], чистый или модифицированный силикагель, сополимер стирола и дивинилбензола, [41], смесь силикагеля с активированным углеродом [42] и др. Содержащиеся в смеси соединения переносятся элюентом в нижнюю часть колонки, перемещаясь с различными скоростями. Таким образом, можно получать фракции, обогащенные соединением выбранной молекулярной массы.

1.5 Модели сборки фуллеренов

Одной из первых моделей образования фуллеренов является их сборка из плоских фрагментов графита, которые складываются в полусферу C_{60} [43]. Однако, эта схема образования фуллеренов не подтвердилась в исследованиях масс-спектров фуллеренов, обогащенных изотопом ^{13}C [44]. В этом эксперименте графитовые слои состояли из углерода ^{12}C , а отдельные атомы – из ^{13}C . Если бы способом образования C_{60} являлось соединение графитовых листов, то в масс-спектре должны были наблюдаться фуллерены, состоящие из углерода ^{12}C . Однако полученный масс-спектр показал, что атомы углерода перемешиваются в плазме.

Другая модель сборки фуллеренов предполагает первоначальную изогнутость углеродного кластера, имеющего форму листка и растущего в плазме при их синтезе

[45]. Связи между атомами такого листка образуют пентагоны и гексагоны. Согласно этой схеме в процессе роста листок сворачивается, чтобы минимизировать число свободных связей. При этом часть растущих кластеров случайно замыкается в фуллерены, а остальные вырастают в «квазиспиральные» частицы сажи. Однако некоторые работы [46, 47] опровергают «квазиспиральную» форму частиц сажи, так как: 1) в ней могут присутствовать атомы водорода, кислорода и других элементов; 2) химические свойства ее частиц ближе к свойствам бензола, чем графита; 3) в ней могут находиться полициклические углеводороды; 4) спектр рассеяния рентгеновских лучей ее частицами ближе к спектру полициклических углеводородов. Таким образом, эта модель оказалась также маловероятной.

Существует ряд схем сборки фуллеренов, которые базируются на идее кластеров-предшественников, содержащихся в среде образования фуллеренов [48-52]. Так в модели образования фуллеренов согласно правилу изолированных пентагонов растущий листок отжигается таким образом, что пентагоны разделяются гексагонами и это в конечном итоге приводит к образованию фуллерена C_{60} . Так как большинство кластеров C_n при $n > 30$ содержат только четное число атомов было предположено, что рост C_{60} осуществляется путем последовательного присоединения фрагмента C_2 [48]. Также существует несколько схем образования фуллерена C_{60} из больших фрагментов: 1) из трех фрагментов C_{20} ; 2) из шести C_{10} ; 3) «сборка из колец» (рис. 5) [53].

Эти модели предполагают, что при n от 10 до 19 кластеры-предшественники представляют собой полициклические плоские листки, а при $n > 20$ – загнутые полициклические листы-полусферы, в структуру которых входят только гексагоны и пентагоны. Так, при добавлении в процессе синтеза фуллеренов водорода в буферный газ были получены углеводороды C_nH_m , содержащие от 15 до 20 атомов углерода [49]. Структура полученных углеводородов была аналогична структуре кластеров-предшественников в рассматриваемых моделях. Однако ряд теоретических и экспериментальных исследований [54-57] показали, что кластеры с n от 15 до 20 атомов являются моноциклическими кольцами, а бициклический кластер C_{10} неустойчив даже при нулевой температуре. Также все полициклические кластеры, состоящие из 11-13 атомов, являются нестабильными.

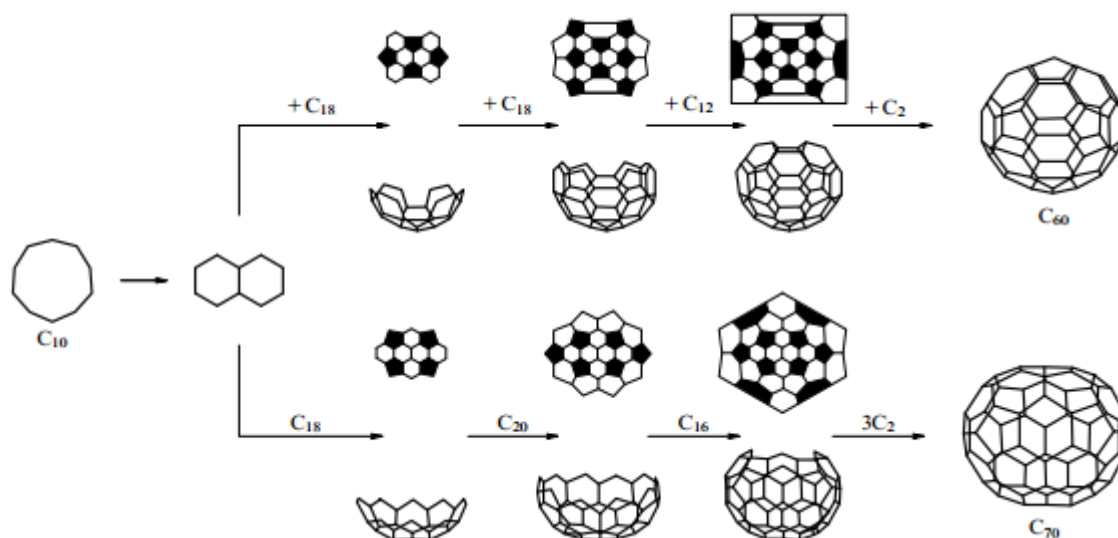


Рис. 5. Модель образования фуллеренов «сборка из колец» [53]

Также предположение о том, что углеродные кластеры с n от 10 до 20 являются плоскими полициклическими листками из гексагонов и пентагонов не подтвердилось другими исследованиями кластеров, полученных при испарении графита, например, в работе [58]. Несмотря на это, нельзя полностью отвергнуть существование неравновесных кластеров со структурой фрагментов фуллерена. Возможно, их концентрация в плазме после образования быстро убывает, если кластеры активно реагируют между собой. И таким образом, их экспериментальное обнаружение сильно затруднено.

Наиболее вероятным путем трансформации углеродных кластеров в фуллерены на данный момент считается кристаллизация «жидкого» кластера. При этом в качестве зародыша при кристаллизации структуры фуллерена предложено рассматривать кластер C_{20} со структурой молекулы корануллена. Остальная часть фуллерена кристаллизуется вокруг одного или нескольких таких зародышей аналогично росту кристалла в жидкости. Все фуллерены содержат четное число атомов, и в большинстве случаев масс-спектр почти не содержит кластеров с нечетным числом n . Это объясняется испусканием атомов и микрокластеров при кристаллизации [53].

В пользу этой гипотезы свидетельствуют результаты исследования спектров ЯМР фуллеренов C_{60} , обогащенных ^{13}C . Они показывают, что атомы, бывшие соседями в аморфном углероде, не являются ими в фуллеренах [44]. Но до сих пор не

удается объяснить, как именно образуется такой «жидкий» кластер-предшественник, содержащий необходимое для формирования фуллеренов количество атомов углерода.

1.6 Типы производных фуллеренов

Фуллерены имеют уникальный набор производных, которые можно разделить на 3 группы (рис. 6). Первую составляют экзоэдральные производные, которые являются продуктами реакций присоединения, в результате которых заместители присоединяются к внешней поверхности молекулы фуллерена. Вторую группу образуют эндоэдральные производные. Они представляют собой комплексы типа «хозяин-гость», где в роли «хозяина» выступает молекула фуллерена, обладающая большой внутренней полостью. К третьей группе относятся производные с корзиноподобной структурой, появившиеся в результате разрыва одной или нескольких связей фуллеренового кора [59].

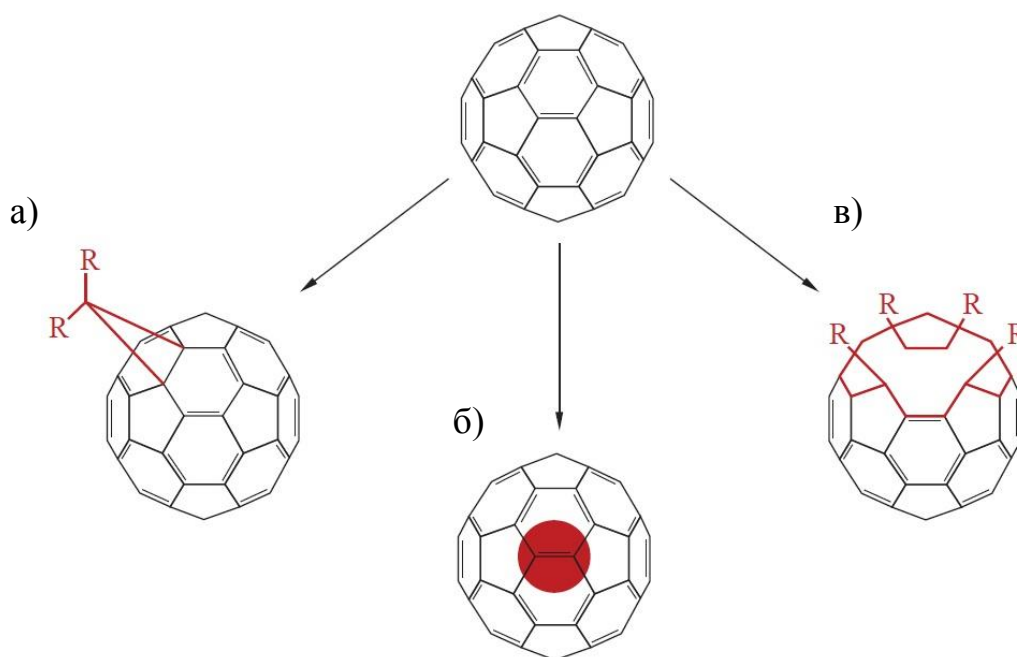


Рис. 6. Типы производных фуллеренов на примере фуллерена C₆₀ : а) экзо -, б) эндо -, в) «корзина» [59]

1.6.1 Эндоэдральные производные фуллеренов

Эндоэдральные производные представляют собой молекулы фуллеренов, которые содержат в своей внутренней полости один или несколько атомов. Молекулы эндофуллеренов могут включать, например, атомы азота, фосфора, гелия. Также

известно большое количество производных фуллерена с инкапсулированными атомами металлов. Например, металлы I группы - Li, Na, K, Cs; II группы - Ca, Sr, Ba; III группы - Sc, Y, La, U; элементы семейства лантаноидов и некоторые металлы IV группы (Ti, Zr, Hf). Также были получены эндофуллерены с четырьмя атомами металла, например, $Sc_n@C_{82}$ ($n = 1-4$). Помимо этого во внутреннюю полость фуллерена могут быть включены небольшие кластеры. Так, например, существуют фуллерены с инкапсулированными кластерами металлов с азотом (Sc_3N , $ErSc_2N$), карбидов и сульфидов металлов (Sc_2C_2 , Sc_2S_2), кластерами с оксидами металлов Sc_4O_2 и Sc_4O_3 [60-66].

Свойства эндофуллеренов зависят от валентности внедренного иона. Так, эндофуллерены, содержащие двухзарядный ион металла второй группы, диамагнитны, а содержащие металл третьей группы, парамагнитны.

1.6.2 Экзоэдральные производные фуллеренов

Экзофуллерены представляют собой производные фуллеренов, которые образуются путем присоединения аддендов к каркасу молекулы фуллерена с внешней стороны. Экзосоединения фуллеренов разделяют на две большие группы – органические производные, образовавшиеся при взаимодействии с органическими соединениями, и неорганические производные – хлориды, гидриды, оксиды, полигидроксильные производные и др.

Образование экзоэдральных производных обусловлено реакционной способностью фуллеренов. С целью ее описания были выделены три основных правила, согласно которым реакции присоединения являются основными реакциями с участием фуллеренов [67, 68]:

а) связь между гексагонами (6-6) короче связи между гексагоном и пентагоном (5-6). Таким образом, 5-6 связь имеет характер одинарной связи, а 6-6 связь подобна двойной связи;

б) атомы углерода в молекуле фуллерена находятся в состоянии sp^2 – гибридизации, что обуславливает высокую стерическую напряженность всей молекулы;

с) молекула C_{60} является электроотрицательной молекулой, которая может быть легко восстановлена, но окислена с большим трудом.

1.7 Общие сведения об аминокислотах

Аминокислоты, наиболее распространенные в природе (так называемые протеиногенные аминокислоты), соответствуют общей формуле $R-CH(NH_2)COOH$, где R – боковая группировка, специфичная для каждой определенной аминокислоты. В твердом состоянии и в сильнополярных растворителях аминокислоты существуют в виде биполярных цвиттер-ионов, что установлено методами ЯМР-, ИК- и КД-спектроскопии по отсутствию полос поглощения amino- и карбоксильных групп. Этот факт обуславливает низкую растворимость аминокислот в неполярных и слабополярных растворителях (этанол, метанол, ацетон) и высокую температуру разложения. Например, наибольшая температура разложения, соответствующая лейцину, составляет 337 °C, а наименьшая, 173 °C, соответствует цистеину. Помимо образования цвиттер-ионов, высокая растворимость аминокислот в полярных растворителях зависит от их строения. Так, соединения с гидрофильной боковой цепью имеют более высокую растворимость [69].

За исключением глицина, все протеиногенные аминокислоты содержат асимметрические атомы углерода, что обуславливает их существование в виде L- или D-стереоизомеров. L-формы аминокислот входят в состав белков и пептидов. Изолейцин и треонин кроме того могут существовать в виде алло-форм, что обусловлено наличием в их молекулах двух хиральных атомов.

Существует несколько методов, которые в настоящее время используют для получения аминокислот: биологический (гидролиз белоксодержащих субстратов) и химический (тонкий органический синтез), химико-энзиматический (энзиматическая трансформация химически синтезированных предшественников аминокислот с образованием L - изомеров) и микробиологический.

Биологический метод является одним из самых ранних способов получения аминокислот. Он предполагает кислотный, щелочной или ферментативный гидролиз белоксодержащего сырья. В качестве такого сырья используют отходы мясоперерабатывающей промышленности (кератиновое сырье, кровь), казеин молока, яичный белок, отходы переработки растений, белки микроорганизмов (кормовые дрожжи). При щелочном и кислотном гидролизе многие аминокислоты разрушаются, а ферментативный гидролиз, хоть и лишен этого недостатка, предполагает сложную подготовку сырья. Таким образом, в процессе гидролиза белок расщепляется на

аминокислоты и пептиды, образуя их смесь. А для извлечения из гидролизата отдельных аминокислот требуется многостадийная очистка. Несмотря на эту сложность и высокую стоимость самого белоксодержащего субстрата, данный метод является важным способом получения аминокислот в составе смеси [70].

Многие аминокислоты получают **химическим методом** (методом тонкого органического синтеза). Однако в его процессе получается смесь D-и L-стереоизомеров, которую трудно разделить. Кроме того, в белках млекопитающих биологически активны только L-стереоизомеры аминокислот, а D-формы не усваиваются организмом или даже являются токсичными. Помимо этого, химическое производство аминокислот связано с использованием дорогостоящего оборудования, агрессивных токсических соединений в качестве исходного сырья и дорогостоящих катализаторов. Однако технология получения аминокислот химическим путем совершенствуется: предлагаются более рациональные методы синтеза, разделения рацемических смесей и способы превращения D-формы в L-форму.

В настоящее время этим методом получают глицин, DL-метионин, глутаминовую кислоту, лизин, триптофан, треонин [71].

Получение аминокислот **химико-энзиматическим методом** проводят в два этапа. Сначала синтезируют соответствующую карбоновую кислоту, а затем из нее получают (обычно в присутствии аммиака) аминокислоту. Второй этап осуществляется ферментами живых клеток, а сам метод является способом получения L-стереоизомеров аминокислот. Например, биотрансформацией получают аспарагиновую кислоту. Для этого раствор фумаровой кислоты пропускают через колонки с подачей аммиака и с иммобилизованными на колонке ферментами или клетками микроорганизмов с высокой активностью аспартазы (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*) [71].

Химико-энзиматическим путем можно получить L-стереоизомеры практически всех аминокислот. Недостатком этого метода является только высокая стоимость соответствующих органических кислот-предшественников.

Микробиологический метод целиком базируется на использовании штаммов-продуцентов аминокислот, что объясняется способностью микроорганизмов синтезировать все L-аминокислоты, а в среде заданного состава при установленных условиях ферментации - обеспечивать их сверхсинтез. Его могут осуществлять

только микроорганизмы-мутанты, полученные с помощью методов генной инженерии.

Наиболее изученными и часто используемыми биообъектами в процессе получения аминокислот микробиологическим методом являются бактерии родов *Escherichia*, *Bacillus*, *Brevibacterium* и *Corynebacterium*. В качестве субстрата используют углеводное сырье (меласса, гидролизаты крахмала и целлюлозы), этанол, органические кислоты, а также углеводороды. Метод является наиболее перспективным, так как позволяет избежать многостадийной и очистки продукта [70].

1.8 Структура аминокислоты треонина

Треонин (2-амино-3-гидроксибутановая кислота или α -амино- β -оксимасляная кислота) относится к группе алифатических полярных нейтральных аминокислот [72].

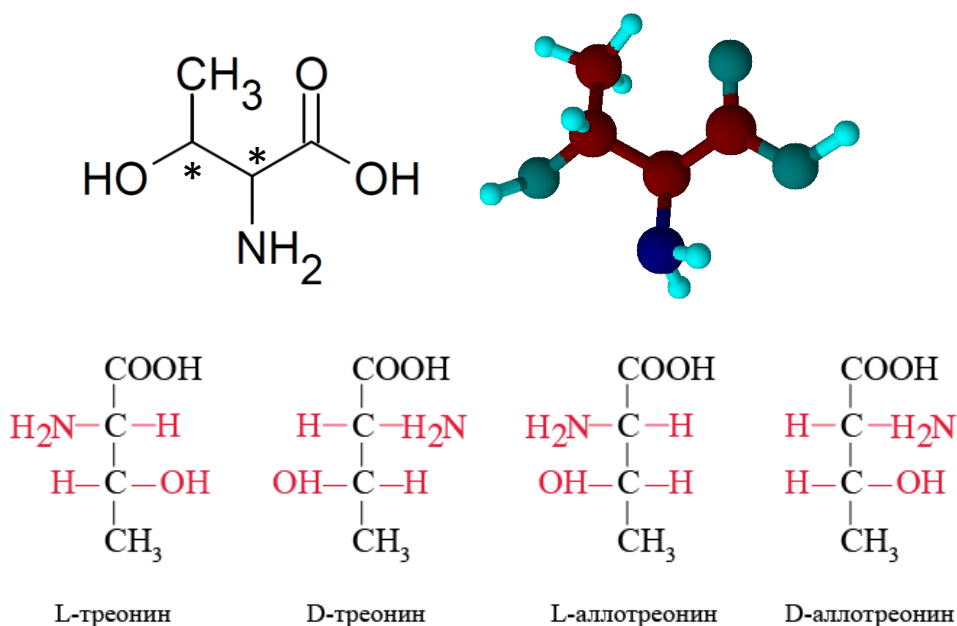


Рис. 7. Структура аминокислоты треонина (L-энантиомер) и его стереоизомеры

Молекула треонина содержит два ассиметричных углеродных атома, что обуславливает существование четырех ее конфигураций: L-треонин (L-Thr), D-треонин (D-Thr), L-аллотреонин (L-aThr) и D-аллотреонин (D-aThr). Тем не менее, в белках обнаружен только один стереоизомер, L-треонин (рис. 7).

Шомейкер Д. П., Донохью Дж., Шомакер В. и Кори Р. Б. изучили кристаллическую структуру L-треонина [73]. Исследуемые образцы были получены из насыщенного водного раствора аминокислоты медленным испарением растворителя при постоянной температуре, после чего был проведен их рентгеноструктурный анализ. Были установлены размеры элементарной ячейки: $a=13,611\text{Å}$, $b=7,738\text{Å}$, $c=5,142\text{Å}$; $\rho_{\text{изм}}=1,464\text{ г/см}^3$; $Z=4$. Модель структуры (рис. 8) была получена из трехмерной функции межатомных векторов, а ее уточнение проведено по трехмерному распределению электронной плотности и расчетами по методу наименьших квадратов. Величины межатомных расстояний и валентных углов оказались близки к их средним значениям у других аминокислот за исключением укороченной связи $\text{C}_3\text{-C}_4$ ($1,50\text{Å}$) и уменьшенной величины угла $\text{C}_2\text{-C}_3\text{-O}_4$ (104°) [74].

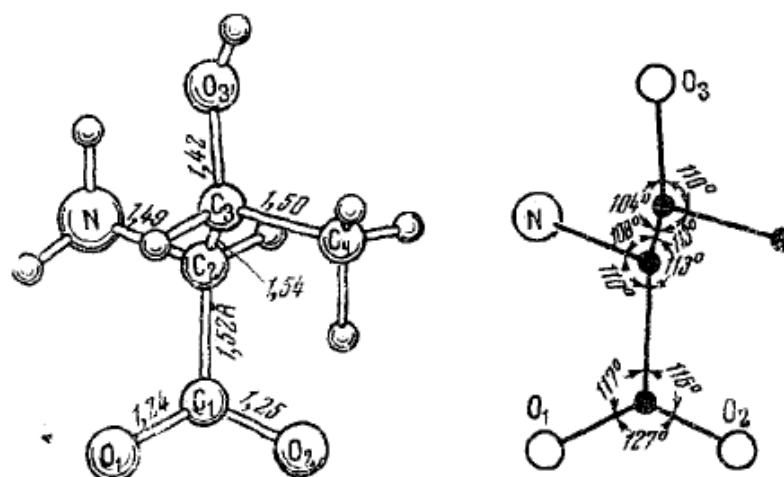


Рис. 8. Шаростержневая модель молекулы треонина с обозначением межатомных расстояний и валентных углов [74]

1.9 Биосинтез треонина

Сведения о путях биосинтеза треонина были получены при исследовании мутанта *Neurospora crassa*. Предполагалась возможность синтеза треонина из гомосерина, так как последний мог заменять треонин и метионин, необходимые для роста исследуемого микроорганизма [75]. Показано, что в культуре мутанта *Neurospora*, нуждающегося только в метионине, происходит накопление треонина и гомосерина [76]. Дрожжи и *Escherichia coli* при росте на средах с меченой уксусной кислотой (C^{13} в метильной группе и C^{14} в карбоксильной группе) синтезируют

треонин и аспарагиновую кислоту, в которых атомы изотопа распределены одинаково [77, 78]. Эти данные подтвердили предположение о том, что гомосерин является предшественником треонина.

В работах [79, 80] установлено, что суспензии мутанта *Escherichia coli*, нуждающегося для роста в треонине, способны превращать аспарагиновую кислоту в гомосерин, а суспензии клеток нормальных штаммов *Escherichia coli* используют гомосерин для синтеза треонина.

Кроме того известно, что существует два промежуточных продукта в процессе превращения аспарагиновой кислоты в треонин: β -аспартилфосфат и β -полуальдегид аспарагиновой кислоты. Промежуточные реакции этого превращения были изучены с использованием очищенных ферментных препаратов, полученных из дрожжей [81-83].

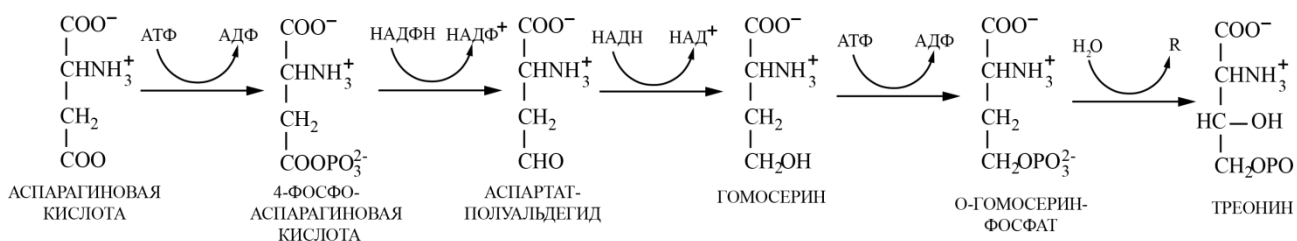


Рис. 9. Схема биосинтеза треонина

Таким образом, было установлено, что L-аспарагиновая кислота в присутствии АТФ, ионов магния и фермента β -аспартокиназы превращается в L- β -аспартилфосфат [81]. А специфический фермент, действующий при участии трифосфопиридиннуклеотида (дегидрогеназа β -полуальдегида аспарагиновой кислоты), восстанавливает β -аспартилфосфат в соответствующую альдегидокислоту [82].

Затем β -полуальдегид L-аспарагиновой кислоты восстанавливается гомосериндегидрогеназой (при участии дифосфопиридиннуклеотида) в β -гомосерин [84]. Было обнаружено, что в первой фазе превращения промежуточным соединением служит β -аспартилкофермент А.

У *Escherichia coli* для превращения гомосерина в треонин необходимо присутствие АТФ и пиридоксальфосфата и, хотя для образования треонина необходимы оба кофактора, для метаболизма гомосерина достаточно присутствия

одной молекулы АТФ. Из этого можно заключить, что процесс превращения гомосерина в треонин протекает с образованием промежуточного соединения (рис. 9).

1.10 Катаболизм треонина

Треонин является незаменимой аминокислотой, то есть он не может быть синтезирован в организме позвоночных и должен входить в состав их пищи.

В некоторых литературных источниках утверждается, что треонин обратимо расщепляется на ацетальдегид и глицин под действием альдолазы [85, 86]. Однако было установлено, что треонинальдолаза не может быть главным ферментом распада треонина, поэтому был сделан вывод о том, что эту функцию выполняют треониндегидратаза и лактатдегидрогеназа (рис. 10). Доказательством этого факта стало отсутствие ферментативной активности альдолазы при удалении треониндегидратазы (методом иммунопреципитации) в цитозольных экстрактах печени крыс [87, 88].

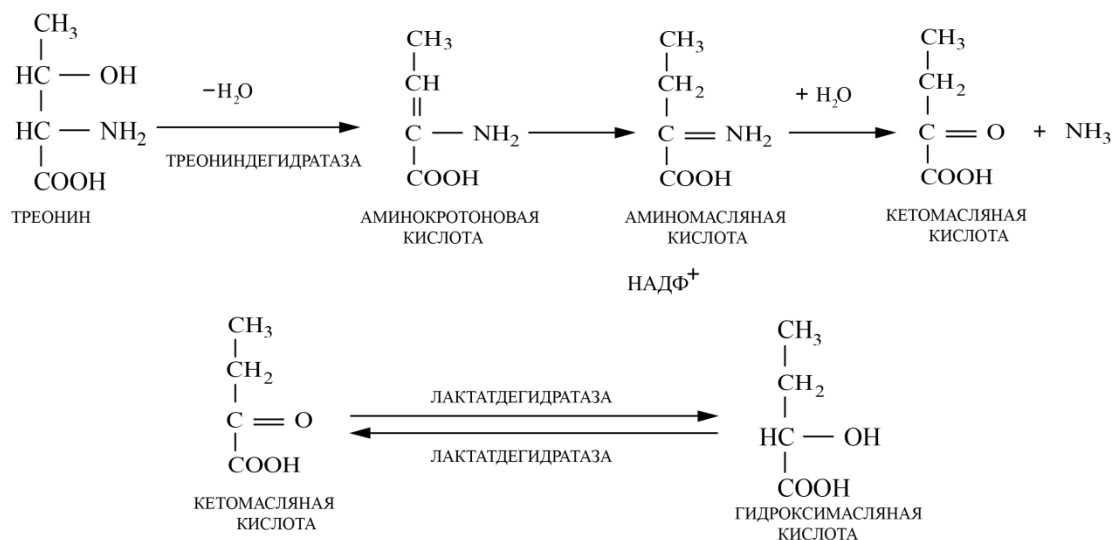


Рис. 10. Распад треонина под действием треониндегидратазы и лактатдегидрогеназы [89]

Помимо цитозоля печени процесс распада треонина может происходить в митохондриях. Ферментом, отвечающим за этот процесс, является треониндегидрогеназа. Она катализирует НАД-зависимое окисление треонина до α-амино-ацетоуксусной кислоты. После чего происходит самопроизвольное декарбоксилирование последней с превращением в аминокетон, либо расщепление до глицина и ацетил-КоА под действием аминокетонсинтетазы (рис. 11).

При этом главную роль в процессе расщепления треонина в условиях недостатка пищевой глюкозы (голодание) играет треониндегидратаза. Таким образом, действие этого фермента в процессе глюконеогенеза обуславливает поддержание уровня глюкозы в крови. В нормальных для организма условиях, когда низка потребность в глюконеогенезе, доминирующую роль в катаболизме треонина играет треониндегидрогеназа. Её физиологическая функция заключается в поддержании уровня треонина, который образуется при расщеплении белков из пищи [89].

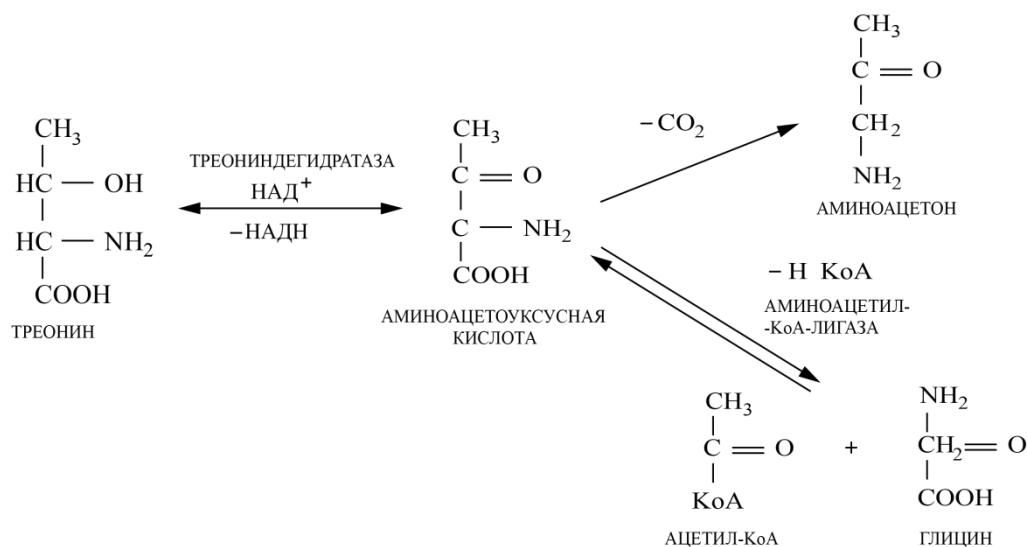


Рис. 11. Схема расщепления треонина треониндегидратазой [89 с изменениями]

Также известны данные по сравнительному анализу экспрессии генов, кодирующих треониндегидрогеназы человека и ряда животных [90]. Предположительно, в процессе эволюции человек утратил способность к синтезу треониндегидрогеназы. Поэтому путь катаболизма треонина у человека – это необратимый распад под действием треониндегидратазы.

1.11 Биологическая активность легких фуллеренов и их производных

В настоящее время легкие фуллерены привлекают внимание исследователей в качестве основы для синтеза биологически активных веществ (БАВ). Такой интерес обусловлен небольшим размером молекул фуллеренов, их липофильностью, химическими и фотофизическими свойствами [59, 91-101].

1.11.1 Взаимосвязь размеров и формы молекул легких фуллеренов с их биологической активностью

Молекулы фуллеренов C_{60} и C_{70} достаточно компактны (диаметр молекулы C_{60} = 0,714 нм; размеры эллипсоида C_{70} - 0,780 нм, 0,694 нм). Следовательно, можно предположить возможность их взаимодействий с компонентами клеток живых организмов, например, низкомолекулярными метаболитами, ферментами, мембранами и мембранными каналами, рецепторами и др. Также весьма вероятно существование структур, способных комплементарно взаимодействовать с фуллереновым кором. В этом случае важную роль играет геометрическое соответствие молекулы биологически активного вещества (БАВ) (фармакофорной области) и биологической мишени, обеспечивающее стабильность образующегося надмолекулярного комплекса.

Например, такой механизм объясняет противовирусную активность производных фуллерена в отношении протеазы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Впервые способность ингибировать протеазу ВИЧ-1 была обнаружена у производного фуллерена C_{60} : N,N'-(2-гидроксикарбонилэтил-карбонил)-n, n'-бис(2-аминоэтил)дифенилметанофуллерен- C_{60} . Было установлено, что ингибирование происходит за счет специфического блокирования субстрат-связывающего центра фермента [91-93]. Также, *in vitro* было обнаружено, что это соединение проявляет активность и против диких штаммов ВИЧ-1, ВИЧ-2, и против азотимидин-устойчивых штаммов ВИЧ-1 [94]. Последующие работы в этой области были направлены на оптимизацию структуры производного фуллерена [91,95].

Еще одним примером биологической активности производных фуллеренов, в основе которой лежит механизм комплементарного специфического взаимодействия, является их способность ингибировать агрегацию β -амилоидных пептидов. β -амилоид является фрагментом высокомолекулярного белка β -APP (белок-предшественник) и продуктом его протеолиза. В результате мутаций в гене этого белка (β -APP) происходит усиленная продукция β -амилоидных пептидов, которые ассоциируют с образованием в межклеточном пространстве сенильных бляшек. Эти плотные агрегированные скопления обладают нейротоксическими свойствами и являются одним из главных нейроморфологических феноменов болезни Альцгеймера.

Известно [96], что 1,2-(диметоксиметано)фуллерен (рис. 12) способен ингибировать агрегацию амилоидных пептидов на ранней стадии по средствам специфического связывания с центральным гидрофобным мотивом (KLVFF) β – амилоидного пептида. Более того, при изучении полимеризации β – амилоидов было установлено, что данное соединение обладает одним из самых низких значений IC_{50} (концентрации полумаксимального ингибирования) среди известных ингибиторов этого процесса. Например, величина данного показателя для мелатонина в четыре раза меньше при связывании с полной последовательностью ($A\beta_{1-40}$) и в 15 раз меньше при взаимодействии с последовательностью, содержащей только одну гидрофобную область ($A\beta_{11-25}$).

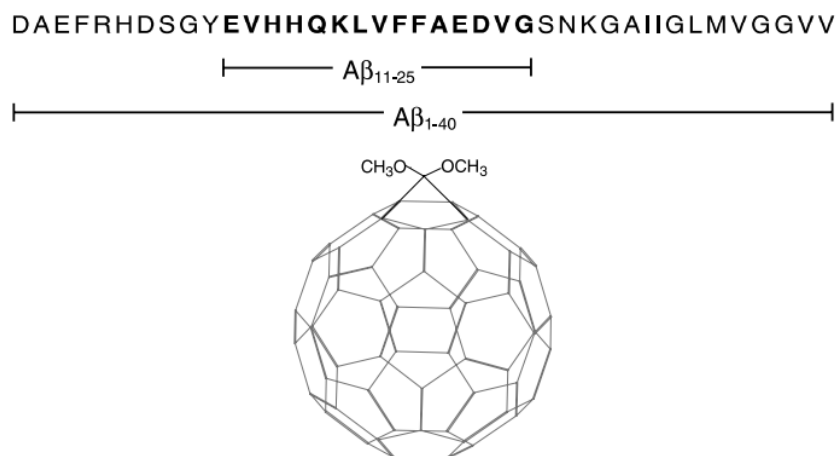


Рис. 12. β – амилоидные пептиды и структура 1,2-(диметоксиметано)фуллерена [96]

1.11.2 Особенности химических свойств легких фуллеренов, обуславливающие их биологическую активность

Одним из характерных свойств молекул легких фуллеренов является их способность легко присоединять свободные радикалы (благодаря наличию двойных связей в молекулах). Это обстоятельство позволяет предположить наличие антиоксидантных свойств рассматриваемых соединений, так как в биологических системах реакции с участием свободных радикалов – в основном реакции окисления.

Активные формы кислорода (АФК), среди которых выделяют супероксидный радикал ($\cdot O_2^-$), синглетный кислород (1O_2), гидроксильный радикал ($\cdot OH$), пероксид водорода (H_2O_2), пероксидный радикал ($HO_2\cdot$) и ион (HO_2^-), гипохлорит (OCl^-) и пероксинитрит ($ONOO^-$) играют важную роль в регуляции основных функций клетки в нормальных и патологических состояниях. В зависимости от силы

воздействующего на клетку патогенного фактора АФК могут индуцировать либо адаптацию к этому воздействию, либо вызвать гибель клеток по пути апоптоза или некроза. Кроме того, они могут оказывать прямое деструктивное действие на клеточные структуры, инициировать свободнорадикальное окисление липидов, белков, нуклеиновых кислот [59].

Установлено, что фуллереновый кор способен выступать в качестве ловушки для свободных радикалов. Было показано, что фуллерен, введенный в липосомы, ингибирует перекисное окисление липидов (ПОЛ), индуцируемое супероксиданион-радикалом и гидроксильным радикалом [97].

Также было обнаружено, что *in vivo* суспензия микронизированного фуллерена ингибирует трансформацию жировых клеток печени в миофибробласто-подобные клетки [98]. Гипотеза о связи этого феномена со способностью C_{60} присоединять свободные радикалы была подтверждена [99]. Установлено, что микронизированный фуллерен является нетоксичным и дозозависимо защищает печень от поражения свободными радикалами.

1.11.3 Фотофизические свойства легких фуллеренов

Легкие фуллерены могут также выступать в роли «генератора» синглетного кислорода. При облучении УФ и видимым светом молекула фуллерена в основном состоянии ($^1C_{60}$) переходит в синглетное возбужденное состояние ($^1C_{60}^*$), которое в свою очередь превращается в возбужденное триплетное ($^3C_{60}^*$). Это состояние передает энергию молекуле триплетного кислорода (3O_2), превращая его в синглетный (1O_2). При этом образование синглетного кислорода является примером двух сопряженных реакций: перехода триплетного состояния фуллерена $^3C_{60}^*$ в синглетное невозбужденное $^1C_{60}$ и превращение триплетного кислорода 3O_2 в синглетный кислород 1O_2 с использованием энергии перехода $^3C_{60}^* - ^1C_{60}$. В результате всех реакций молекула фуллерена не претерпевает никаких химических превращений и может участвовать в этом цикле многократно (рис. 13).

Также, в возбужденном состоянии молекула фуллерена является более сильным акцептором электронов, чем в основном. Таким образом, при наличии в среде доноров электронов возбужденные состояния могут восстанавливаться и превращаться в анион-радикал. При этом в присутствии кислорода анион-радикал может отдавать один электрон молекуле кислорода, превращая ее в супероксиданион-

радикал. Таким образом, в зависимости от среды фуллерен способен генерировать различные АФК.

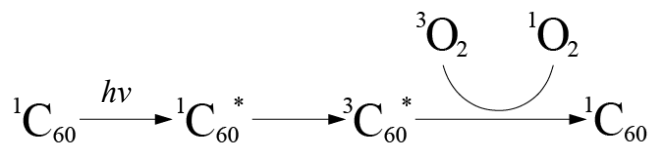


Рис. 13. Образование синглетного кислорода фуллереном C_{60} при фотовозбуждении [59]

Известно, что при облучении суспензии вирусов леса Семлики (SFV) и везикулярного стоматита (VSV) в присутствии фуллерена C_{60} в среде, обогащенной кислородом, их инфекционная активность снижается более чем на 7 lg/мл за 6-8 часов. Было установлено, что инактивация вирусов зависела как от освещения, так и от присутствия кислорода. При этом введение в систему глутатиона или гидрохинона (ловушек для свободных радикалов) не влияло на противовирусное действие C_{60} , что свидетельствовало о связи наблюдаемого эффекта только с действием синглетного кислорода [100].

Также противовирусная активность фуллеренов, активируемая облучением, была обнаружена на модели безоболочечного вируса MVM (minute virus of mice) [101]. В присутствии фуллерена C_{60} при пропускании кислорода наблюдалось падение инфекционной активности более чем на 5 lg/мл в течение 3-5 часов.

1.11.4 Липофильность легких фуллеренов

Одним из важнейших свойств, определяющих биологическую активность легких фуллеренов, является их липофильность. Это свойство связано со способностью молекул потенциального БАВ проникать через липидный бислой (мембранотропные свойства) и его распределением в организме. Для оценки липофильности вещества обычно используют парциальный коэффициент ($\log P$), который показывает распределение этого соединения между липидной и водной фазами. Было показано, что для бензойной кислоты, модифицированной фуллереном, $\log P > 4$, что указывает на его высокую липофильность. Например, для такого достаточно липофильного соединения как ксилон $\log P = 3,20$, для гексаметилбензола $\log P = 4,98$ [59]. Значение данного показателя для диэтилового эфира составляет 0,98.

1.12 Водорастворимые производные фуллеренов и их биологическая активность

Одним из необходимых условий изучения биологической активности какого-либо соединения и поиска его дальнейшего применения в области медицины является гидрофильность. Однако фуллерены неспособны к растворению в воде и водных растворах. Например, истинная растворимость фуллерена C_{60} в воде при $25^{\circ}C$ составляет $1.3 \cdot 10^{-11}$ г/л, а фуллерена C_{70} в тех же условиях - $1.1 \cdot 10^{-13}$ г/л [102].

Существует два основных метода перевода фуллеренов в водорастворимую форму: 1) нековалентное взаимодействие с водорастворимыми носителями, например поливинилпирролидоном [103], циклодекстринами [104], белками или липосомами [105, 106]; 2) химическая модификация с помощью присоединения полярных групп, например гидроксильных [107], карбоксильных [108] или аминок групп [109].

Первый метод позволяет вводить в организм фуллерены, не изменяя их систему сопряжения, а значит и физико-химические свойства. Однако вследствие гидрофобности, возникает проблема их выведения из организма. Было установлено, что фуллерены способны накапливаться в печени [110], легких [111], костях [112] и других органах, при этом время их нахождения в организме составляет более 28 дней [111].

Второй подход лишен этого недостатка. Однако число присоединенных групп может оказывать существенное влияние на структуру, а, следовательно, и на свойства полученных соединений.

1.12.1 Фуллеренолы

Под термином «фуллеренол» (в англоязычной литературе также используют термин «фуллерол») понимают как производные фуллерена C_{60} состава $C_{60}(OH)_x$, так и гидроксипроизводные других индивидуальных фуллеренов $C_n(OH)_x$ ($n = 60, 70, 76, 78, 84, 90$). Фуллеренолы, помимо гидроксильных групп, могут содержать другие функциональные группы (например, кислородсодержащие группы, группы солевого типа). Также к фуллеренолам относят смесь индивидуальных фуллеренолов различного состава, либо индивидуальные фуллеренолы низкой чистоты (менее 95 %) [113].

Существует ряд способов синтеза фуллеренолов с различным числом гидроксильных групп.

Известны работы [114–116], в которых описывается реакция фуллерена с тетрафтороборатом нитрониума в присутствии ароматической кислоты в безводной среде. Гидролизом эфирных функциональных групп полиорганокарбоксилированных производных фуллерена были получены водорастворимые фуллеренолы $C_{60}(OH)_n$ с 18–20 гидроксильными группами [115]. Существует способ получения фуллеренола при нагревании толуольного раствора C_{60} с металлическим калием, однако, такой фуллеренол является крайне нестабильным под воздействием света, тепла, а также в основной среде [117].

Фуллеренолы с 24–26 гидроксильными группами можно получить реакцией фуллерена с водным раствором NaOH в присутствии гидроксида тетрабутиламмония [118]. Было установлено [119], что полученный таким образом фуллеренол является стабильным радикал-анионом молекулярной формулы $Na_n^+ [C_{60}O_xOH_y]_n^-$ (где $n = 2–3$, $x = 7–9$, $y = 12–15$). Вместо гидроксида тетрабутиламмония в качестве катализатора также можно использовать полиэтиленгликоль (ПЭГ)-400 [120]. Фуллеренолы получают в реакции C_{60} с водным раствором NaOH в присутствии ПЭГ-400 в атмосфере воздуха при комнатной температуре. Полигидроксильированный фуллеренол $C_{60}(OH)_{22}$ был синтезирован путем полного замещения атомов брома в $C_{60}Br_{24}$ в щелочной среде [121].

Известно, что молекула C_{60} проявляет высокую химическую активность по отношению к реакции присоединения радикала диоксида азота (NO_2). В работе [122] радикал диоксида азота получали в результате реакции нитрита натрия с концентрированной HNO_3 . Такая химическая функционализация C_{60} привела к образованию полинитрофуллеренов $C_{60}(NO_2)_n$. Их гидролизом в водном растворе NaOH были получены соответствующие фуллеренолы с 16 гидроксильными группами с небольшим общим выходом.

Для введения гидроксильных групп в фуллерены также можно использовать реакцию со смесью растворов серной кислоты, нитрата калия и воды при температуре 85–95°C [123]. Было установлено, что синтезированные фуллеренолы обладали хорошей растворимостью в кислой среде, а при pH раствора выше 9 выпадали в осадок. Используя эту особенность, удалось очистить полученные фуллеренолы от присутствующих примесей. Было определено, что фуллеренолы содержали в среднем 14–15 гидроксильных функциональных групп.

Фуллеренолы, синтезированные разными методами, имеют похожие ИК-спектры, в которых проявляются интенсивные полосы гидроксильных групп при 3400 см^{-1} , валентных колебаний C–O при 1070 см^{-1} и C=C при 1600 см^{-1} . Однако во всех случаях речь идет о сложных смесях продуктов, структура которых неизвестна [4].

Биологическая активность фуллеренолов представляет большой интерес для поиска возможных применений в области медицины.

Фуллеренолы обладают антиоксидантными свойствами [124, 125], противораковой и противовирусной активностью [126]. Также они способны предотвращать ишемию, которая вызывается резким увеличением АФК при энергетическом истощении органов и тканей [127, 128].

Было предложено несколько механизмов проявления антиоксидантной активности фуллеренола $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ [129]: 1) гидроксильные радикалы могут вступать в реакцию с двойными связями фуллеренола с образованием $\text{C}_{60}(\text{OH})_{x+2n}$; 2) гидроксильные радикалы могут оторвать один электрон от структуры фуллеренола, образуя катион-радикал $\text{C}_{60}(\text{OH})_x^+$; 3) гидроксильный радикал может отрывать атом водорода от гидроксильных групп фуллеренола, образуя относительно стабильный и менее токсичный радикал фуллеренола $\text{C}_{60}(\text{OH})_{x-1}\text{O}^*$.

Было установлено, что фуллеренол $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ обладает антипролиферативными свойствами (препятствует делению клеток) и благодаря своей способности присоединять свободные радикалы предотвращает цитотоксичные последствия применения доксорубина, использующегося в химиотерапии рака [129-131]. Кроме того, доксорубин, конъюгированный с фуллеренолом, продемонстрировал противораковую эффективность сравнимую с действием чистого доксорубина, но не проявлял его системной токсичности [132], в особенности кардиотоксичности.

Известно, что фуллеренол $\text{C}_{60}(\text{OH})_{44}$ обладает антибактериальной и противогрибковой активностью [133]. Противогрибковая активность фуллеренолов достаточно высока. По-видимому, фуллеренолы способны к взаимодействию с в большей степени с углеводными компонентами клеточных стенок грибов, такими как β -глюкан и хитин, чем с пептидогликанами клеточных мембран бактерий.

Также фуллеренолы могут найти применение в качестве противоаллергических средств [134]. Фуллеренол $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$, наряду с N-этил-полиамино- C_{60} ($\text{C}_{60}(\text{NEt})_x$) исследовались в отношении тучных клеток и базофилах

периферической крови человека, принимающих активное участие в развитии аллергических реакций. Тучные клетки обнаружены в большинстве тканей тела и участвуют в развитии аллергической реакции. Они содержат большое количество цитоплазматических гранул, при активации тучных клеток высвобождаются соединения (например, гистамин), которые вызывают определенные симптомы, варьирующие от незначительной аллергической реакции до жизни угрожающей анафилактической реакции.

АФК, образуемые в тучных клетках, играют ведущую роль в патогенезе многих патологий, таких как воспаление, ревматический артрит, астма, псориаз, крапивница и контактный дерматит [135]. Антиоксиданты, которые подавляют АФК в тучных клетках, ингибируют дегрануляцию. Было установлено, что ингибирование уровня АФК фуллеренами приводит к ослаблению иммунного ответа. А в экспериментах *in vivo* на мышах анафилаксия предотвращается введением производных фуллерена, без проявления токсического эффекта.

1.12.2 Карбоксилированные производные фуллеренов

Карбоксилированные производные фуллеренов также проявляют биологическую активность.

Например, под действием УФ-излучения C_{60} -малонаты способны вызывать гибель клеток *HeLa* [136]. В этой же работе установлено, что число остатков малоновой кислоты, присоединенных к фуллереновому ядру влияет на фотоцитотоксичность производных фуллерена (в ряду DMA- C_{60} , TMA- C_{60} , QMA- C_{60} фотосенсибилизирующее действие на рост клеток *HeLa* убывает).

Известно, что карбоксифуллерены могут подавлять нейрональный апоптоз, вызванный агонистами глутаматных рецепторов NMDA и AMPA, и нейтрализовать действие амилоидного пептида, ответственного за возникновение болезни Альцгеймера. Они задерживают развитие функциональных нарушений и гибель ~~емерть~~ крыс, имеющих мутантный ген СОД человека. Также, эти соединения способны связывать супероксидный анион и H_2O_2 , являются эффективными ингибиторами перекисного окисления липидов. Было установлено, что при введении в боковые желудочки мозга карбоксифуллерен может устранять последствия окислительного поражения, вызванные реперфузионной ишемией [137].

1.12.3 Производные фуллеренов с аминокислотами

Производные фуллеренов с аминокислотами также обладают широким спектром биологической активности. Установлено, что соединения C₆₀-DL-аланин и C₆₀-DL-аланил-DL-аланин *in vitro* способны проникать через фосфолипидные мембраны липосом, не нарушая их целостность [138]. Мембранотропные свойства производных фуллерена C₆₀ также были исследованы на модели мембран симбиосом и мембран эритроцитов человека. Было показано, что C₆₀-пролин, C₆₀-ε-аминокапроновая кислота и C₆₀-аргинин транспортируются через биологические мембраны как липофильные ионы, таким образом, вызывая их деполяризацию [139].

Известно, что производные фуллеренов с аминокислотами могут обладать противоопухолевой активностью. Например, изучено влияние производного фуллерена C₆₀ с глицином на клетки человеческой карциномы шейки матки *HeLa* (при облучении и без облучения) и клетки мышинной остеосаркомы *LM8* (при облучении) методами МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) и проточной цитометрии. Было обнаружено, что гибель опухолевых клеток при облучении (вольфрамовая галогенная лампа, 500-600 нм, 108 Дж/см²) имеет дозозависимый эффект (при концентрации C₆₀-глицина 100 мкг/мл погибает 33,56% опухолевых клеток) [140].

В работе [141] описан синтез водорастворимых производных фуллерена C₆₀ с аминокислотами L-фенилаланином и L-аргинином, а также соединение C₆₀ с фолиевой кислотой и рассмотрена возможность их применения в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии. Изучение фототоксичности рассматриваемых соединений проводилось с помощью МТТ-анализа после облучения видимым светом (32,4 Дж / см²) клеток *HeLa*, инкубированных с каждым из этих соединений. Жизнеспособность клеток, инкубированных с C₆₀-L-фенилаланином, C₆₀-фолиевой кислотой, и C₆₀-L-аргинином в концентрации 5 мкг/мл снижалась до 44,2%, 27,4% и 76,4% по сравнению с контрольным значением, соответственно. При этом фототоксический эффект увеличивался с ростом фотоиндуцированной генерации АФК [141]. Со способностью генерировать АФК при облучении связывают активность C₆₀-L-лизина, который вызвал фотоиндуцированное расщепление ковалентных связей в молекуле ДНК в присутствии НАД [142].

Кроме того, благодаря уникальной электронной структуре производные фуллерена с аминокислотами могут обладать антиоксидантной и антирадикальной активностями. В работе [143] рассмотрен синтез соединений C_{60} - β -аланин, C_{60} - L-цистин, C_{60} - L-аргинин и изучено их влияние на клетки *PC12* (клетки феохромоцитомы). Было показано, что эти производные фуллерена уменьшают накопление АФК и клеточное повреждение, вызванное действием перекиси водорода. Авторы предполагают, что одним из важнейших факторов, обуславливающих этот протективный эффект, является агрегация производных [143]. Также исследовались биологические эффекты C_{60} -L-пролина на ферментативную активность Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума [144,145]. Было обнаружено, что помимо антиоксидантной активности соединение обладает нейропротективными свойствами.

В работе [146] описан синтез водорастворимых производных фуллерена C_{60} с натриевыми солями аминотетрауксусной и ϵ -аминокапроновой кислот, а также гибридные структуры на основе производного фуллерена с пролином и карнозином (β -аланил-L-гистидин). Рассматриваемые производные обладали антиоксидантной активностью. Впервые авторами была обнаружена взаимосвязь между подавлением развития цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) и с активацией ПОЛ. Более того был получен эффективный ингибитор ЦМВИ из класса аминокислотных производных фуллерена [146]. Также противовирусная активность была обнаружена у гидрата фуллерен - (трис-аминокапроновой кислоты) в нетоксичных концентрациях (до 100 мкг/мл) в отношении респираторно-синцитиального вируса [147].

Анализ литературы, посвященной изучению производных фуллеренов, позволяет сделать следующие выводы о современном состоянии исследований в данной области:

а) большая часть синтезов производных фуллеренов, описанных в литературе, относится к модификации фуллерена C_{60} . В то же время количество работ, относящихся к получению производных фуллерена C_{70} , весьма немногочисленно. Так как физико-химические свойства и биологическая активность соединений, синтезированных на основе C_{60} и C_{70} , могут существенно различаться, это обстоятельство не дает возможности проследить связь «структура - физико-химические свойства - биологическая активность» того или иного производного легкого фуллерена;

б) в большинстве публикаций, посвященных синтезу производных фуллеренов, не была проведена полная идентификация полученных соединений. Таким образом, во многих случаях нельзя однозначно говорить истинном химическом составе синтезированных соединений. Также в значительном количестве работ не приводятся методики синтеза;

с) методики синтеза, представленные в литературе, позволяют получать исключительно небольшие количества производных фуллеренов (мг). Отсутствуют работы по масштабированию их синтезов;

д) весьма немногочисленны работы, относящиеся к изучению физико-химических свойств производных легких фуллеренов, а также изучению фазовых равновесий растворимости. Это обстоятельство лишает возможности проследить взаимосвязь физико-химических свойств с проявлением биологической активности, что затрудняет оптимизацию и разработку наиболее перспективных направлений практического использования данного класса соединений;

е) представленные в литературе данные по биологической активности производных фуллеренов являются неполными. Данные о молекулярных механизмах проявления биологической активности носят фрагментарный характер. Во многих работах достоверно не установлен молекулярный механизм ее проявления.

Таким образом, описанные обстоятельства подтверждают актуальность данного исследования и определяют выбор цели и постановку его задач.

2 Экспериментальная часть

2.1 Синтез производных легких фуллеренов с L-треонином

Синтез производного фуллерена C_{60} с L-треонином был проведен следующим образом. Навеску L – треонина (3,178 г) и гидроксида натрия (15,757 г) растворили в 54 мл воды. NaOH использовался для перевода аминокислоты в натриевую форму и создания сильнощелочной среды (что является условием реакции). Затем к полученному раствору добавили 267 мл этанола (для обеспечения взаимной растворимости о-ксилола и воды) и насыщенный раствор фуллерена C_{60} в о-ксилоле (1 г C_{60} в 131,5 мл о-ксилола). После чего полученная реакционная смесь перемешивалась на магнитной мешалке при комнатной температуре в течение 7 дней.

Таблица 3. Характеристика реагентов

Реагент	Формула	Чистота	Производитель
легкие фуллерены	C_{60}	99,5%	ООО НПК «НеоТекПродакт», СПб
	C_{70}	98,5%	
L - треонин	$C_4H_9NO_3$	$\geq 99\%$	«Sigma-Aldrich»
гидроксид натрия	NaOH	ХЧ	ВЕКТОН, СПб
о-ксилол	$C_6H_4(CH_3)_2$		
этанол	C_2H_5OH		

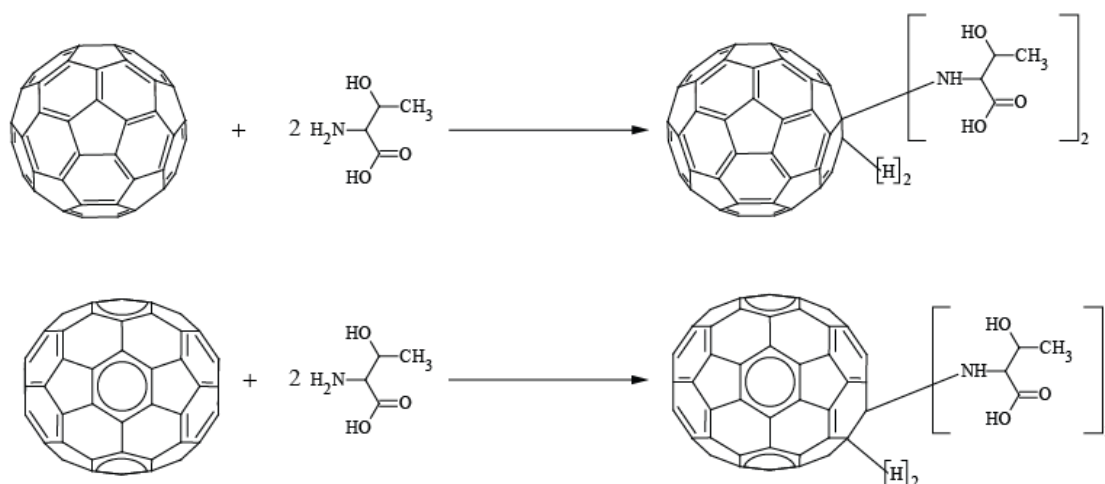


Рис. 14. Схема реакций легких фуллеренов с L-треонином

Аналогичным образом был проведен синтез производного фуллерена C_{70} с L-треонином. Схемы реакций приведены на рисунке 14, характеристики используемых реагентов представлены в таблице 3.

Затем была проведена стадия выделения продукта. Полученную смесь отделили от растворителей с помощью роторного испарителя и растворили образовавшийся на стенках колбы порошок в воде. Затем отфильтровали раствор от нерастворимых примесей реагентов. Далее проводили перекристаллизацию аддукта фуллерена C_{60} и аддукта фуллерена C_{70} с треонином с помощью этанола. После чего полученный осадок был промыт от щелочи этанолом до нейтральной реакции среды ($pH=7$). Полученное соединение было высушено при $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Выход продукта составил 80%.

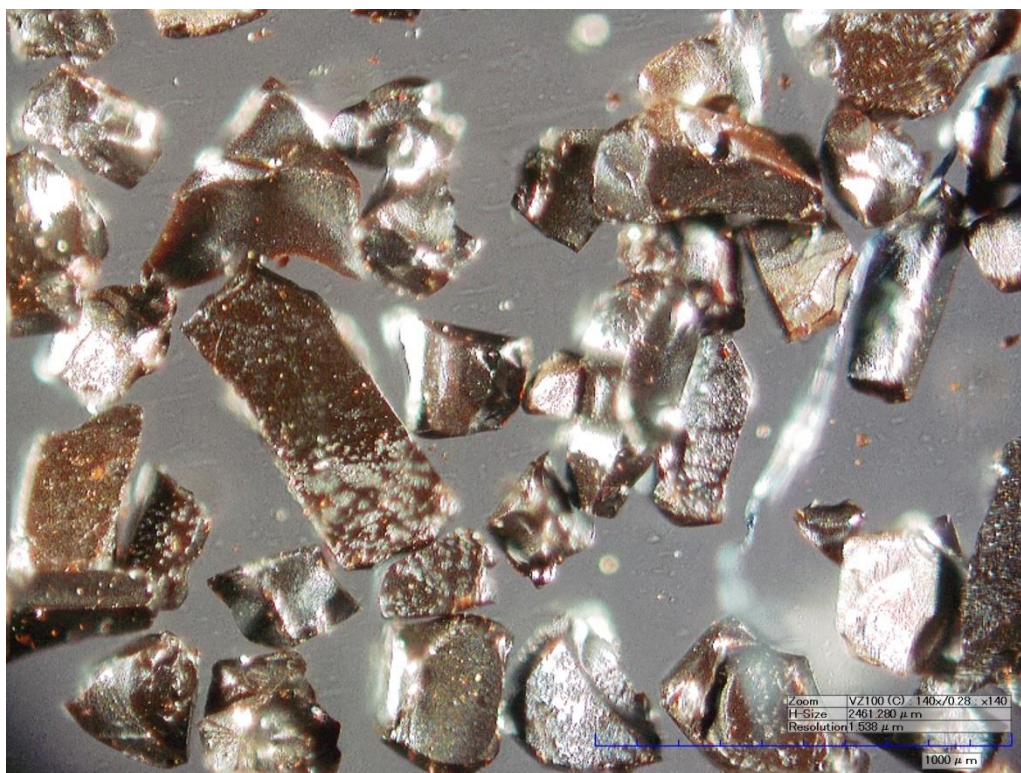


Рис. 15. Фотография кристаллов производного C_{60} с L-треонином ($C_{60}(C_4H_9NO_3)_2$)

2.2 Идентификация производных легких фуллеренов с L-треонином

Идентификация полученных производных фуллеренов C_{60} и C_{70} с треонином предполагала использование методов: высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), ИК- и УФ-спектроскопии, элементного анализа, термогравиметрии, масс-спектрометрии.

Методом ВЭЖХ была определена чистота синтезированных соединений. Условия хроматографического анализа: колонка – «Phenomenex® NH2» (150x2,0 мм, 5 мкм, 100 Å); элюент – ацетонитрил/водный раствор трифторуксусной кислоты

(0,1%) (5:95), 0,2 мл/мин; объем дозируемой пробы – 20 мкл; детектирование – диодная матрица; температура колонки – 40°C.

С помощью элементного анализа был установлен состав полученных производных легких фуллеренов с треонином. Определение содержания углерода, азота и водорода в образцах проведено на элементном C, H, N - анализаторе EuroEA3028-НТ.

Термогравиметрический анализ проведен с помощью синхронного термического анализатора Netzsch STA 449 F3 Jupiter на температурном интервале 30 ÷ 1050 °C при скорости нагревания 5 °C/мин.

Также с целью идентификации полученных соединений были получены их ИК–спектры поглощения на приборе SHIMADZU FTIR-8400S. В опытах использовались таблетки бромида калия – KBr (высушенный в Ar), область приведенных частот составила $\nu \approx 400 \div 4000 \text{ см}^{-1}$.

Кроме того, были получены спектры электронного поглощения водных растворов легких фуллеренов с L – треонином. Измерения проводились с помощью спектрофотометра SPECORD M-32 в кварцевых кюветах «КВ-1» шириной 1см в области 200 ÷ 800 нм. В качестве раствора сравнения использовалась дистиллированная вода.

При длине волны $\lambda=330$ нм была получена концентрационная зависимость оптической плотности образцов и проверена выполнимость закона Бугера-Ламберта-Бера (4,5). Данный закон хорошо выполняется для истинных разбавленных растворов, однако при повышении концентрации возможны значительные отклонения от него, что объясняется агрегацией молекул, нелинейными оптическими явлениями.

$$I = I_0 \cdot e^{-a' \cdot l} = I_0 \cdot e^{-\varepsilon' \cdot C \cdot l} \quad (4)$$

или

$$D = -\lg(T) = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad (5)$$

где I_0 и I - интенсивности света падающего и прошедшего через слой вещества соответственно;

a' - натуральный бугеровский коэффициент поглощения [1/см];

С - концентрация поглощающих центров [моль/л];
 l - толщина слоя образца [см];
 T - пропускание образца;
 D - оптическая плотность образца;
 ε' и ε - натуральный и десятичный коэффициенты экстинкции соответственно [л/моль·см]

В результате были рассчитаны натуральные коэффициенты экстинкции для определения концентрации производных легких фуллеренов с треонином по оптической плотности на длине волны 330 нм.

2.3. Исследование свойств производных легких фуллеренов с L-треонином

2.3.1 Объемные свойства водных растворов производных легких фуллеренов с L-треонином при 25 °С

С целью изучения объемных свойств растворов синтезированных соединений методом пикнометрии была получена концентрационная зависимость их плотности. В эксперименте были использованы кварцевые пикнометры с рабочим объемом ≈ 10 см³, стандартизированные по чистому растворителю (H₂O – дист.), точность термостатирования составила $\Delta T = \pm 0.05$ К, точность определения плотности $\Delta \rho = \pm 0.0002$ г/см³.

Концентрационные зависимости среднего молярного объема водных растворов производных легких фуллеренов с L-треонином были получены в соответствии формулой 6.

$$\bar{V} = \frac{V}{n_{H_2O} + n_{C_{60}-Thr}} \quad (6)$$

где: \bar{V} -объем водного раствора C₆₀-треонина; n_{H_2O} и $n_{C_{60}-thr}$ – число моль воды и C₆₀-треонина в 1 дм³ раствора.

Также были получены концентрационные зависимости парциальных молярных объемов компонентов бинарных растворов:

$$V_{H_2O} = \left(\frac{\partial V}{\partial n_{H_2O}} \right)_{T,p,n_{C_{60}-Thr}} \quad (7)$$

$$V_{C_{60}-Thr} = \left(\frac{\partial V}{\partial n_{C_{60}-Thr}} \right)_{T,p,n_{H_2O}} \quad (8)$$

где V – объем раствора, n_{H_2O} и $n_{C_{60}-Thr}$ – число моль воды и C_{60} -треонина

Расчет проводился по известным соотношениям, связывающим средние и парциальные молярные функции:

$$V_{H_2O} = \bar{V} - x_{C_{60}-Thr} \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial x_{C_{60}-Thr}} \right)_{T,p} \quad (9)$$

$$V_{C_{60}-Thr} = \bar{V} - x_{H_2O} \left(\frac{\partial \bar{V}}{\partial x_{H_2O}} \right)_{T,p} \quad (10)$$

где $x_{C_{60}-Thr}$ и x_{H_2O} – мольные доли C_{60} -треонина и воды соответственно.

2.3.2 Удельная и молярная рефракции водных растворов производных легких фуллеренов с L-треонином

Для изучения рефракции водных растворов синтезированного соединения были получены экспериментальные данные по показателям преломления водных растворов производных легких фуллеренов с L-треонином. Измерения проводились при 25°C с помощью рефрактометра фирмы Mettler Toledo. Точность термостатирования составила $\Delta T = \pm 0.10$ К, точность определения $\Delta n_D^{25} = \pm 0.0001$ отн.ед. Полученные данные представлены на рисунке 15.

Из данных по плотности и показателям преломления были рассчитаны концентрационные зависимости удельной (r) и молярной (R) рефракции растворов при 25°C в соответствии со следующими формулами:

$$r = \left(\frac{n_D^2 - 1}{n_D^2 + 2} \right) \frac{1}{\rho} \quad (10)$$

$$R = \left(\frac{n_D^2 - 1}{n_D^2 + 2} \right) \frac{\bar{M}}{\rho} \quad (11)$$

где \bar{M} – средняя молярная масса раствора; ρ – плотность раствора; n_D – показатель преломления раствора

Также, удельная и молярная рефракции были рассчитаны согласно правилу аддитивности рефракций:

$$r = (r_{H_2O} \cdot \omega_{H_2O} + r_{C_{60}(C_4H_9NO_3)_2} \cdot \omega_{C_{60}(C_4H_9NO_3)_2}) / 100 \quad (12)$$

$$R = R_{H_2O} \cdot x_{H_2O} + R_{C_{60}(C_4H_9NO_3)_2} \cdot x_{C_{60}(C_4H_9NO_3)_2} \quad (13)$$

где r_i , R_i – удельная и молярная рефракции i -того компонента, ω_i , x_i – массовая и молярная доли i -того компонента.

Таким образом, зная значение рефракции воды, можно рассчитать значения молярной и удельной рефракций полученных производных легких фуллеренов.

Также молярная рефракция производных легких фуллеренов с L-треонином была рассчитана по правилу аддитивности Эйзенлора:

$$R^{\text{аддит.}} = 68R_C + 2R_{O(-OH)} + 4R_{O(=CO)} + 2R_{N(-NH_2)} + 18R_H \quad (14)$$

Соответственно, были найдены значения удельной рефракции по формуле (15).

$$r^{\text{аддит.}} = \frac{R^{\text{аддит.}}}{M[C_{60}(C_4H_9NO_3)_2]} \quad (15)$$

2.3.3 Политермическая растворимость производных легких фуллеренов с L-треонином в воде и температурная зависимость плотности насыщенных растворов

Методом изотермического насыщения в ампулах была изучена растворимость производных легких фуллеренов с L-треонином в воде в интервале температур $20 \div 80$ °С. Насыщение проводилось в водном шейкер-термостате, точность термостатирования составила $\Delta T = \pm 0,1$ К, частота встряхивания $\nu \sim 2$ Гц, время насыщения $t \sim 8$ ч., после цикла насыщения пробы отстаивались в течение 30 мин. Концентрация определялась путем измерения оптической плотности при длине волны 330нм. Методом пикнометрии в тех же условиях изучена температурная зависимость плотности насыщенных водных растворов. Использованы составила $\Delta T = \pm 0,1$ К, точность определения $\Delta \rho = \pm 0,0002 \div 0,0005$ г/см³.

2.3.4 Изучение концентрационной зависимости электропроводности водных растворов производных легких фуллеренов с L-треонином. Расчет кажущейся степени диссоциации, концентрационных и термодинамической констант диссоциации

Для исследования электропроводности производных легких фуллеренов с L-треонином были получены экспериментальные данные по удельному сопротивлению его водных растворов. Измерения проводились с помощью измерительного устройства - иммитанса HAMEG HM8118 (Rohde & Schwarz), температура $T = 25 \pm 0,2$ °С, использовались платиновые электроды. На основании полученных данных рассчитаны удельная (16) и молярная (17) электропроводности, кажущаяся степень диссоциации (18) и константа диссоциации (19).

$$k = \frac{1}{\rho} \quad (16)$$

где k – удельная электропроводность водных растворов C₆₀-L-треонина;

ρ – удельное сопротивление растворов, (Ом · см);

$$\lambda = \frac{1000 k}{C_M} \quad (17)$$

где λ – молярная электрическая проводимость;

C_M – молярность раствора (моль·дм⁻³);

$$\alpha = \frac{\lambda}{\lambda_0} \quad (18)$$

где α – кажущаяся степень диссоциации;

λ_0 – молярная электропроводность в бесконечно разбавленных растворах;

$$K_D = \frac{C_M \alpha^2}{(1-\alpha)} \quad (19)$$

Также путем экстраполяции зависимости $K_D (C_M)$ в область бесконечно разбавленных растворов по формуле 20 была рассчитана термодинамическая константа диссоциации.

$$K_D^{\text{терм.}} = \lim_{C_M \rightarrow 0} (K_D) \quad (20)$$

2.3.5 Определение размеров ассоциатов производных легких фуллеренов с L-треонином в воде методом динамического светорассеяния

Методом динамического рассеяния света были определены размеры ассоциатов в системах производное фуллерена C_{60} с L-треонином -вода и производное фуллерена C_{70} с L-треонином-вода. Измерения были проведены на приборе Malvern Zeta Nanosizer при 25°C.

В ходе эксперимента были исследованы водные растворы производных легких фуллеренов с L-треонином в интервале концентраций $C = 0,01 - 10$ г/л. При больших концентрациях растворы становились непрозрачными и не могли быть использованы при данном методе исследования.

Также были определены оценочные значения $N_{i/i+1}$ (среднее число ассоциатов i -го порядка в ассоциате $i+1$ порядка), рассчитанные по соотношению:

$$N_{i \rightarrow (i+1)} = \left(\frac{d_{i+1}}{d_i} \right)^3 \cdot K_y \quad (21)$$

где $K_y \approx 0,52$ - формальный коэффициент упаковки в случае «малых сфер, упакованных в большие»

2.3.6 Исследование поверхностных явлений в водных растворах производного легкого фуллерена C₇₀ с L-треонином

Изучение поверхностных явлений в растворах производного легкого фуллерена C₇₀ с L-треонином осуществлялось методами пластинки Вильгельми, микроскопии под углом Брюстера (Brewster angle microscopy; BAM), атомно-силовой микроскопии (Atomic force microscopy; AFM).

Методом пластинки Вильгельми (метод уравнивания пластинки) была изучена кинетика изменения поверхностного натяжения в растворах производного C₇₀ с L-треонином. Измерения были проведены на установке, схема которой изображена на рисунке 16.

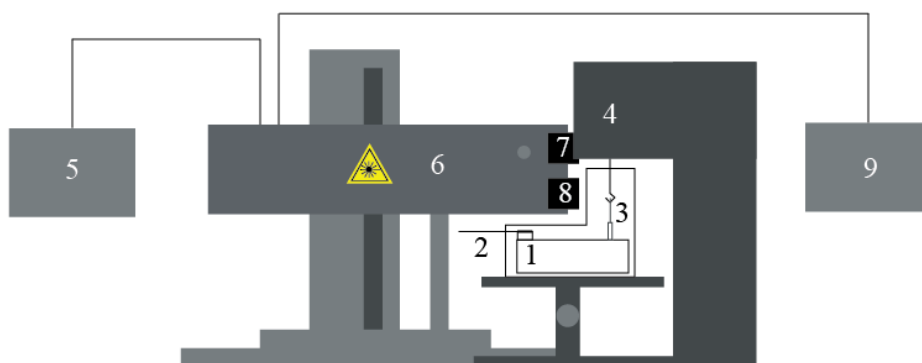


Рис. 16. Схема экспериментальной установки для исследования поверхностных явлений методами пластинки Вильгельми и микроскопии под углом Брюстера: 1 – кювета с раствором и стеклянной пластинкой; 2 – барьер с держателем; 3 – платиновая пластинка на подвесе; 4 – электронные микровесы; 5 – блок питания/манипулятор; 6 – гелий-неоновый лазер; 7 – пучок лазерного излучения; 8 – камера; 9 – компьютер

Платиновая и стеклянная пластинки, кювета и барьер были промыты хромовой смесью, а затем дистиллированной водой. Далее, высушенная платиновая пластинка была помещена на подвес (3). В кювету (1) заливался исследуемый раствор, и пластинка опускалась до соприкосновения с его поверхностью. Предварительно поверхность раствора была обновлена с помощью водоструйного насоса, чтобы удалить возможные загрязнения. Исходя из показаний электронных микровесов,

фиксируются значения массы пластинки, используемые для расчета поверхностного натяжения:

$$\gamma = mk \quad (22)$$

где $k = \gamma(H_2O)/m$ (пластинки) – постоянная, зависящая от характеристик пластинки, значение которой было найдено из калибровочных опытов с водой.

На основании полученных экспериментальных данных была построена изотерма поверхностного натяжения.

Морфология пленок, образующихся на поверхности водных растворов производного легкого фуллерена C_{70} с L-треонином была исследована *in situ* с помощью микроскопа при угле Брюстера компании NFT (Германия), снабженного 10mW He-Ne лазером.

Также, методом атомно-силовой микроскопии были изучены пленки производного фуллерена C_{70} с L-треонином, полученные методом Шайфера.

2.4 Исследование биологической активности производных легких фуллеренов с L-треонином

2.4.1 Изучение влияния производных легких фуллеренов с L - треонином на физиолого-биохимические характеристики клеток человека

а) Изучение цитотоксичности и противоопухолевой активности производных легких фуллеренов с L - треонином на примере C_{60} -L-треонина

Для оценки цитотоксичности полученного производного фуллерена C_{60} с L-треонином был проведен МТТ-тест (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) на эпителиальных (HEK293) и опухолевых (A172, A549) клетках человека. Клетки культивируются в CO_2 -инкубаторе при $37^\circ C$ в увлажненной атмосфере, содержащей воздух и 5% CO_2 в питательной среде DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Биолот), содержащей 10% (об/об) термически инактивированную фетальную бычью сыворотку (FBS; HyClone, США), 1% L-глутамина (BioloT), 50 Ед/мл пенициллина (BioloT) и 50 мкг/мл стрептомицина (BioloT).

Тетразолиевый краситель МТТ восстанавливается при действии НАД(Ф)Н-зависимых клеточных оксидоредуктаз с образованием окрашенного продукта формазана с максимумом поглощения при длине волны 540 нм, содержание которого пропорционально количеству жизнеспособных клеток (рис. 17).

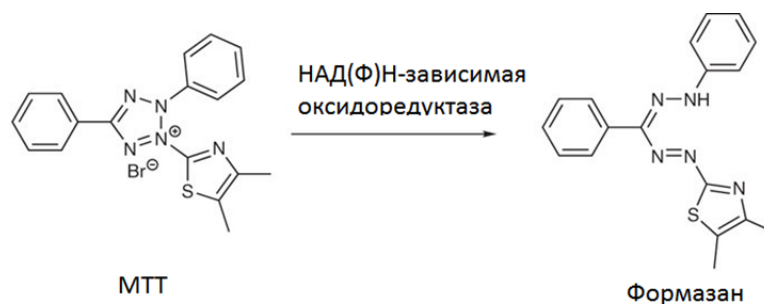


Рис. 17. Схема реакции восстановления тетразолиевого красителя МТТ

Клетки высевали в 96-луночный планшет и ставили для инкубации в течение ночи в CO_2 -инкубатор: за это время происходило прикрепление клеток к поверхности лунок (в каждую лунку вносилось 10 000 клеток в 200 мкл среды DMEM). Подсчет числа клеток проводился на анализаторе жизнеспособности клеток BioRad TC10. После чего в лунки были добавлены растворы, содержащие C_{60} -L-треонин.

Инкубация клеток в планшетах продолжалась 48 часов в CO_2 -инкубаторе при 37 °C. По окончании инкубационного периода, культуральную среду DMEM сливали путем инвертирования планшета. Далее в лунки вносилось 100 мкл среды DMEM и 20 мкл МТТ-реагента и планшеты с клетками инкубировались в течение 1 часа в CO_2 -инкубаторе при 37 °C. После удаления надосадочной жидкости кристаллы формазана растворяли в течение 15 мин при перемешивании в 200 мкл/лунку диметилсульфоксида (ДМСО) и измеряли оптическую плотность на планшетном спектрофотометре BioRad xMarx при длине волны 540 нм и 690 нм. Для коррекции фона из значений оптической плотности при 540 нм вычитают значения оптической плотности при 690 нм для соответствующих лунок. Данные нормируют в процентах по отношению к контрольным клеткам.

б) Изучение влияния производного фуллерена C_{60} с L-треонином на гемолиз эритроцитов крови человека спектрофотометрическим методом

Для изучения влияния производного фуллерена C_{60} с L-треонином на гемолиз эритроцитов крови человека были получены образцы крови от здоровых добровольцев. Отделение эритроцитов проводили центрифугированием при 2000 g в течение 5 мин. Затем эритроциты промывали 5 раз изотоническим раствором хлорида натрия. После промывки собранные эритроциты ресуспендировали в изотоническом растворе хлорида натрия и добавляли тестируемые вещества. Затем образцы инкубировали в течение 1 ч при 37°C в CO_2 -инкубаторе. По окончании

инкубационного периода повторяли центрифугирование при 2000 g в течение 5 мин для осаждения эритроцитов. Аликвоты супернатантов переносили в 96-луночный планшет и анализировали спектрофотометрически при длине волны 415 нм, которая соответствует максимуму поглощения гемоглобина.

2.4.2 Изучение влияния производного легкого фуллерена C₆₀ с L - треонином на физиолого-биохимические характеристики растений

а) Влияние производного фуллерена C₆₀ с L - треонином на качественные характеристики семян *Lepidium sativum* (кресс-салат; с. «Ажур»)

Оценка влияния производного фуллерена C₆₀ с L - треонином на физиолого-биохимические характеристики растений предполагала определение его концентраций, оказывающих положительное, нейтральное и ингибирующее действие на всхожесть семян, длину корней, ростков, проростков. Растворы в количестве 10 мл вносили в чашки Петри с уложенными в них бумажными фильтрами. На увлажненные фильтры помещали семена тестовой культуры кресс-салата сорта «Ажур» в количестве 50 штук на чашку. В качестве контроля использовали водопроводную воду. На третьи сутки проращивания проводили учет энергии прорастания семян, на седьмые сутки осуществляли подсчет всхожести и измерения длины корней и побегов проростков кресс-салата. В каждом варианте опыта было по 3 повторности.

б) Влияние производного фуллерена C₆₀ с L-треонином на показатели физиологического состояния и нетто-продуктивности *Hordeum vulgare* (яровой ячмень; с. Ленинградский)

Оценка влияние производного фуллерена C₆₀ с L-треонином на рост растений и эффективность работы фотосинтетического аппарата в листьях была проведена в двух вегетационных экспериментах, проведенных в регулируемых условиях микроклимата при выращивании растений в сосудах с аэрируемыми питательными растворами на специализированном вегетационно-облучательном оборудовании при полностью искусственном освещении. При этом раствор производного фуллерена C₆₀ с L-треонином вводили в питательный раствор макро- и микроэлементов в концентрации 1 мг/л раствора. В качестве контроля использовали растения, выращенные на питательном растворе без аддукта фуллерена C₆₀ с L-треонином. Аэрирование раствора в сосудах осуществляли непрерывно с помощью компрессоров и

воздухопроводящих элементов (трубки, переходники, распылители). Смену растворов в сосудах наряду с контролем pH осуществляли через каждые трое суток.

Продолжительность светового периода составляла 14-часов, температуру поддерживали в пределах $25 \pm 2^\circ\text{C}$, относительную влажность воздуха - $65 \pm 5\%$.

Для оценки физиологического состояния вегетирующих растений был применен метод спектроскопии отраженной от поверхности листьев радиации. Спектры отражения листьев растений регистрировали *in situ* с помощью миниатюрной оптоволоконной спектрометрической системы фирмы Ocean Optics (США), которая обеспечивает оптическое разрешение 0.065 нм.

Спектры получали для полностью сформированного, закончившего рост 4 листа, выполняя измерения не менее чем у 10 растений варианта в 2-кратной повторности. В каждом варианте записывали не менее 20 спектров, по которым рассчитывали индексы отражения согласно формулам 23, 24.

$$\text{ChlRI} = \frac{R750 - R705}{R750 + R705 - 2R445} \quad (23)$$

$$\text{ARI} = R750 \left(\frac{1}{R550} - \frac{1}{R700} \right) \quad (24)$$

Оба индекса находятся в тесной корреляционной связи (хлорофилл – положительной, антоцианы – отрицательной) с нетто продуктивностью растений, и позволяют оценить физиологическое состояние растений.

Площадь листовой ассимилирующей поверхности (ЛАП) определяли по формуле 25.

$$S = \frac{P \times S1 \times n}{P1} \quad (25)$$

где S=ЛАП,

S1 – площадь одной высечки, взятой из листа пшеницы или ячменя;

n – количество высечек;

P – общий вес листьев [г];

P1 – вес высечек [г]

с) Изучение влияния производного фуллерена C_{60} с L-треонином на работу антиоксидантной системы *Hordeum vulgare* (яровой ячмень; с. Ленинградский)

Антиоксидантные свойства растений оценивались по следующим параметрам:

1) интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ); 2) содержание активных форм кислорода (АФК); 3) активность супероксиддисмутазы (СОД).

Интенсивность ПОЛ определяли в листьях ячменя по накоплению продукта окисления — малонового диальдегида (МДА), определяемого по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Для этого навеску свежего материала (300 мг) гомогенизировали в 0,5 % ТБК в 10 % водном растворе трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

Реакционную смесь инкубировали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, фильтровали и измеряли оптическую плотность фильтрата при длине волны 532 нм и 600 нм. Контролем служила среда выделения с реагентом. Концентрацию МДА рассчитывали в микромолях на 1 г сырой массы и использованием молярного коэффициента экстинкции, равного $1,56 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$. Генерацию супероксидного анион-радикала ($\cdot\text{O}_2^-$) определяли по методу, основанному на превращении адреналина в адренохром, оптическую плотность которого измеряли при 480 нм. Навеску листьев и корней (300 мг) гомогенизировали в 10 мл дистиллированной воды. Гомогенат центрифугировали 20 мин при 2500 g. По 3 мл супернатанта помещали в две пробирки, в одну из которых добавляли 100 мкл 5,6 мМ раствора адреналина, в другую - 100 мкл дистиллированной воды (контроль). Реакционную смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре в свете люминесцентной лампы. После окончания экспозиции измеряли оптическую плотность раствора, содержавшего адреналин, против раствора с дистиллированной водой.

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) осуществляли методом, в основе которого лежит ее способность конкурировать с нитросиним тетразолием в реакции за супероксидные радикалы. Навеску листьев и корней (300 мг) гомогенизировали в 1,5 мл 50 мМ фосфатного буфера (pH 7,6) и центрифугировали при 6500 g. Реакционная смесь состояла из 1,5% раствора L-метионина, 0,14% раствора нитросинего тетразолия и 1% раствора Тритона X-100. К 1 мл реакционной смеси добавляли 50 мкл 4,4% раствора рибофлавина и инкубировали 30 мин в свете люминесцентной лампы. Измерения оптической плотности проводили против среды выделения (контроль) при длине волны 560 нм. За единицу активности принимали 50% ингибирование образования формазана. Активность СОД выражали в единицах

активности. Все измерения проводились в трехкратной повторности, кроме определения активности супероксиддисмутазы, определяемой в четырехкратной повторности.

По завершении вегетационного опыта на 30 сутки от начала замачивания семян в тестируемых растворах измеряли биометрические показатели роста растений (длина корней и «надземной части», число стеблей, число листьев на главном стебле, общая масса растения и масса его органов: листьев, корней, стеблей). При этом показатель «длина корней» определялся по размерам самого длинного корешка, а «длина надземной части» - по высоте самого высокого побега для каждого растения.

3 Обсуждение результатов

3.1 Идентификация производных легких фуллеренов с L-треонином

На рисунке 18 представлены хроматограммы полученных соединений, полученные методом ВЭЖХ. В результате было определено, что чистота производного фуллерена C_{60} с L-треонином составляет 99.5% (а), а чистота аддукта фуллерена C_{70} с треонином равна 97 %.

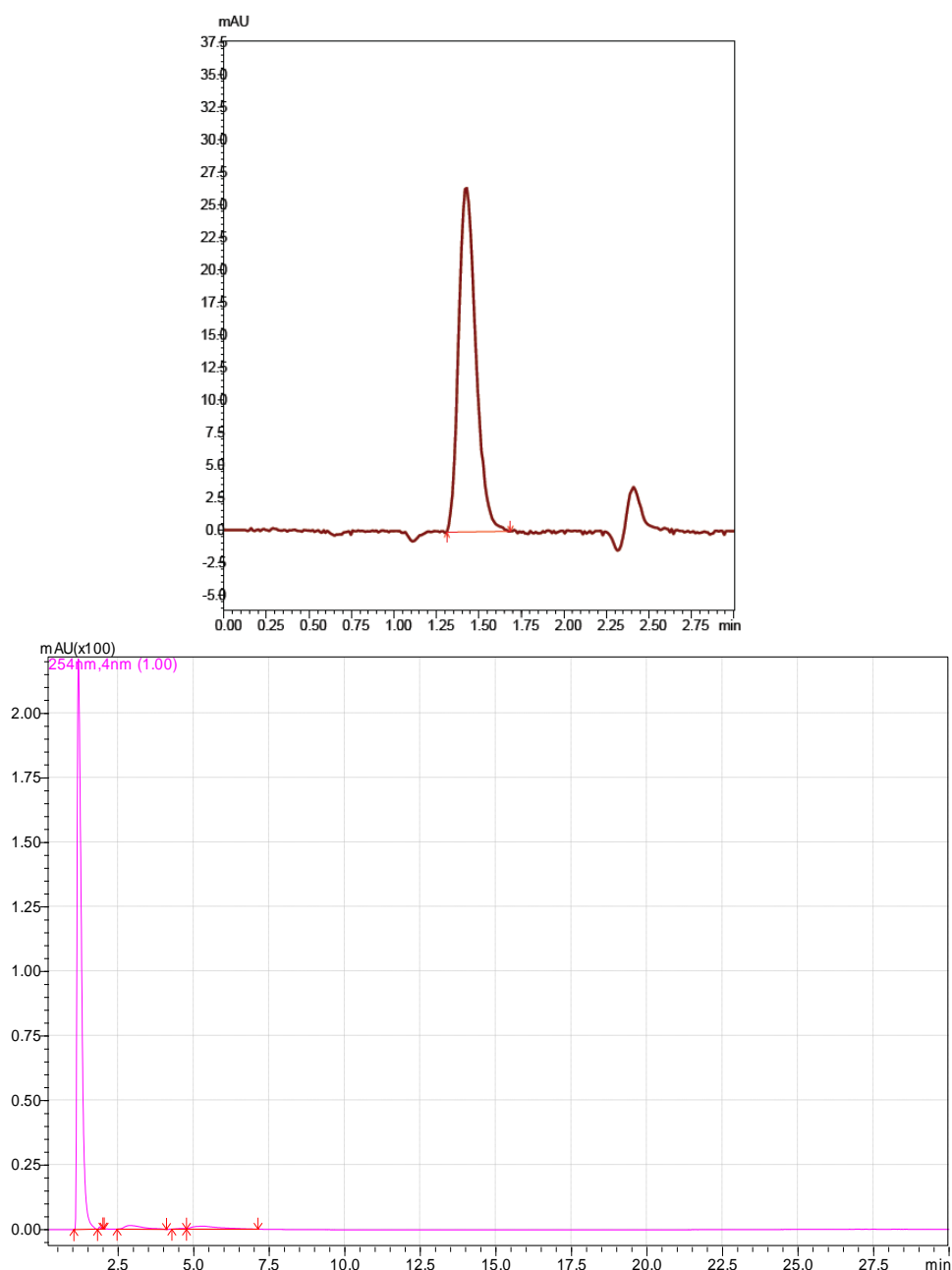


Рис. 18. Хроматограммы производных фуллеренов C_{60} (а) и C_{70} (б) с L-треонином

На основании данных, полученных методом элементного анализа (таблица 4), было определено, что производное фуллерена C_{60} с L-треонином является гексагидратом бис-аддукта $C_{60}(C_4H_9NO_3)_2 \cdot 6H_2O$.

Таблица 4. Элементный анализ производного фуллерена C_{60} с треонином

Элемент	Теоретическое количество $C^{расч.} (\% \text{ масс})$	Экспериментальное количество $C^{экспер.} (\% \text{ масс})$
C	$77,0 \pm 0,3$	$77,0 \pm 0,3$
H	$2,6 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,2$
N	$2,6 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,2$

Результаты термогравиметрического анализа производного фуллерена C_{60} с треонином приведены на рисунке 19. На основании данной термограммы были предположены следующие термоокислительные процессы: а) при температуре 303,15 К происходит дегидратация $C_{60}(C_4H_9NO_3)_2 \cdot 6H_2O$; б) при 473,15 К инициируется разложение аминокислотного остатка производного C_{60} с треонином, обусловленное его дегидратацией, декарбоксилированием и деазотированием; с) при 1023,15 К начинается частичное окисление фуллеренового кора.

Аналогичные данные были получены для производного фуллерена C_{70} с треонином. Было определено, что соединение является кристаллогидратом следующего состава $C_{70}(C_4H_9NO_3)_3 \cdot 6H_2O$.

Также, для идентификации синтезированных веществ получены ИК–спектры поглощения, представленные на рисунках 20, 21.

На спектрах обоих соединений присутствуют характеристические пики ОН-группы аминокислотного остатка: пик на интервале $1400-1410 \text{ см}^{-1}$, соответствующий деформационным колебаниям, и пик в интервале $3300-3500 \text{ см}^{-1}$, соответствующий валентным колебаниям. Также присутствуют пики деформационных колебаний группы NH_2 ($1577-1585 \text{ см}^{-1}$), пики валентных колебаний групп CH (2250 см^{-1} и 2750 см^{-1}) и. пики валентных колебаний групп CO (1100 см^{-1}).

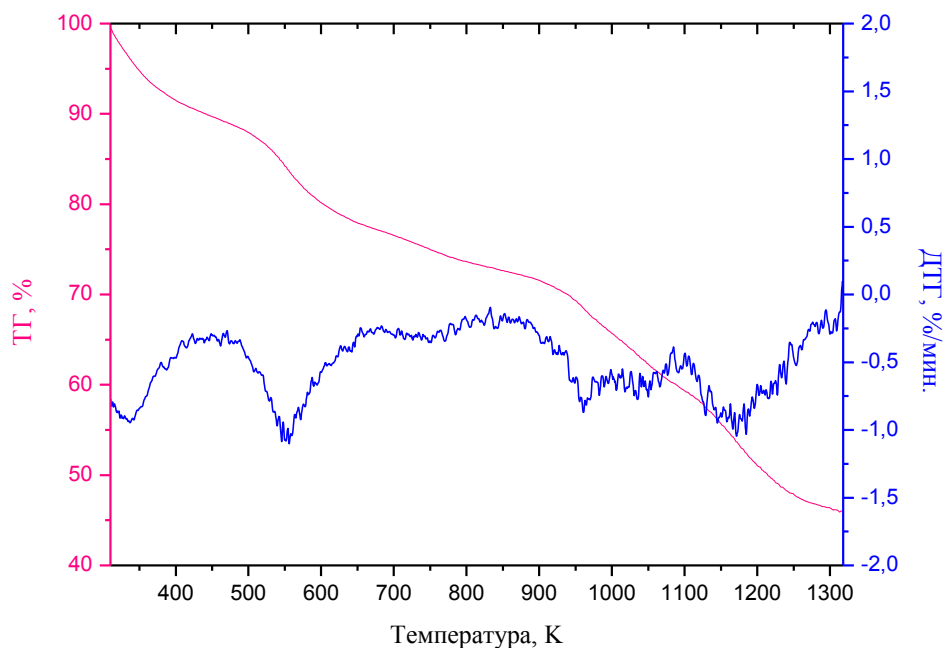


Рис. 19. Термограмма и дериватограмма $C_{60}(C_4H_9NO_3)_2 \cdot 6H_2O$

Таблица 5. Результаты термогравиметрического анализа производного фуллерена C_{60} с треонином

№	T^M ; К ($T^H - T^K$); К	$\frac{\Delta m_i^{\text{расч.}}}{m_0}$; %	$\frac{\Delta m_i^{\text{эксп.}}}{m_0}$; %	Химический процесс
1	343,15 (303,15 - 443,15)	10,7	10,2	$C_{60}[NH_2-CH(CH(OH)CH_3)-COOH]_2 \cdot 6H_2O \rightarrow C_{60}[NH_2-CH(CH(OH)CH_3)-COOH]_2 + 6H_2O$
2	550,15 (473,15 - 673,15)	12,2	11,7	$C_{60}[NH_2-CH(CH(OH)CH_3)-COOH]_2 \rightarrow C_{60}[NH_2-CH=CH-CH_3]_2 + 2CO_2 + 2H_2O$
3	853,15 (673,15 - 993,15)	11,1	10,5	$C_{60}[NH_2-CH=CH-CH_3]_2 + 9,5 O_2 \rightarrow C_{60} + 6CO_2 + 7H_2O + N_2$
4	1123,15 (1023,15 - 1273,15)	>19	>19	Частичное окисление C_{60}

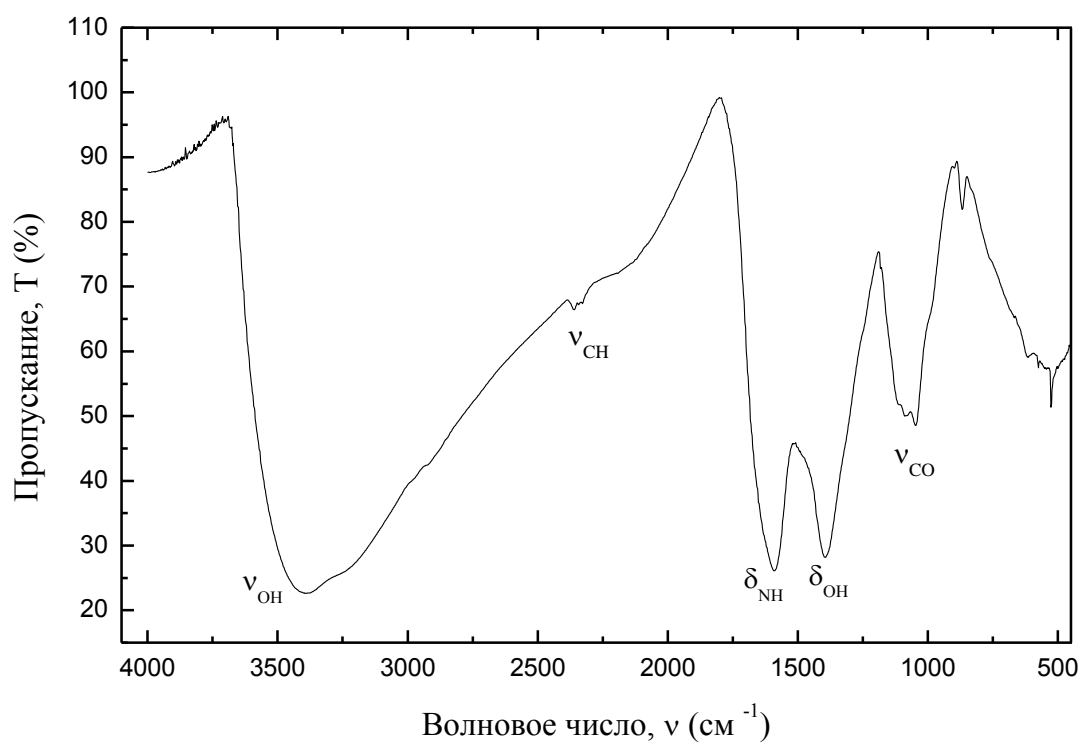


Рис. 20. ИК-спектр производного C_{60} с L - треонином

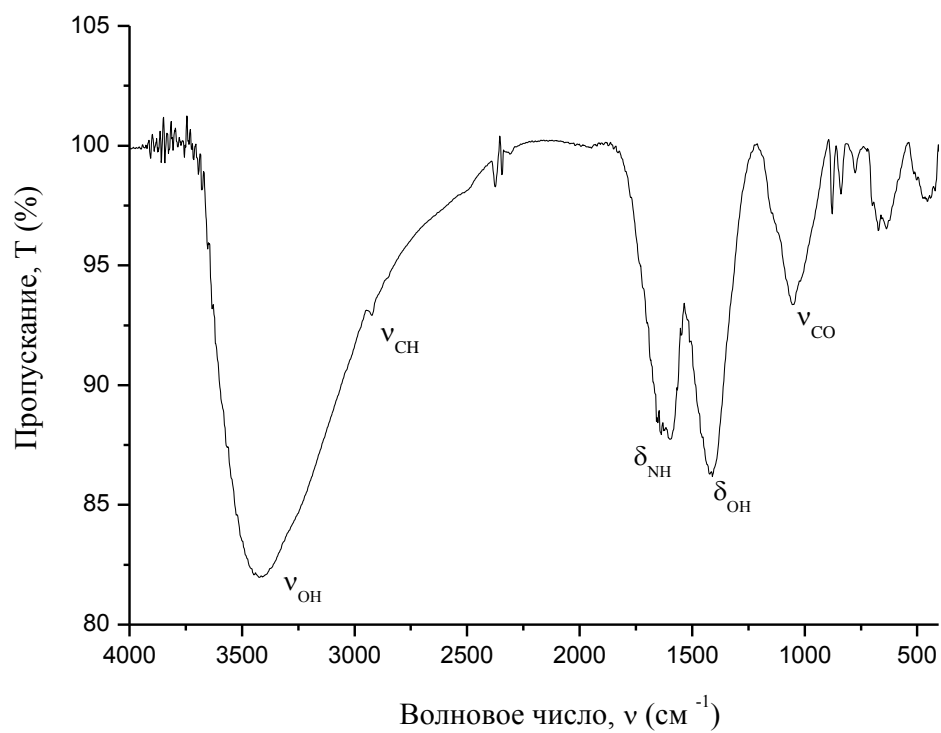


Рис. 21. ИК-спектр производного C_{70} с L - треонином

Кроме того, были получены спектры электронного поглощения водных растворов легких фуллеренов с L-треонином (рис. 22, рис. 24). Концентрационные зависимости оптической плотности исследуемых растворов представлены на рисунках 23, 25.

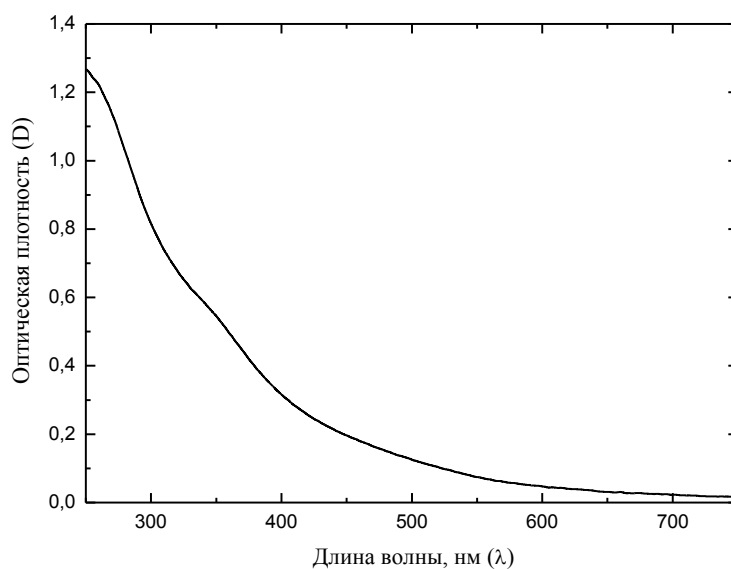


Рис. 22. Спектр электронного поглощения раствора производного C_{70} с L – треонином

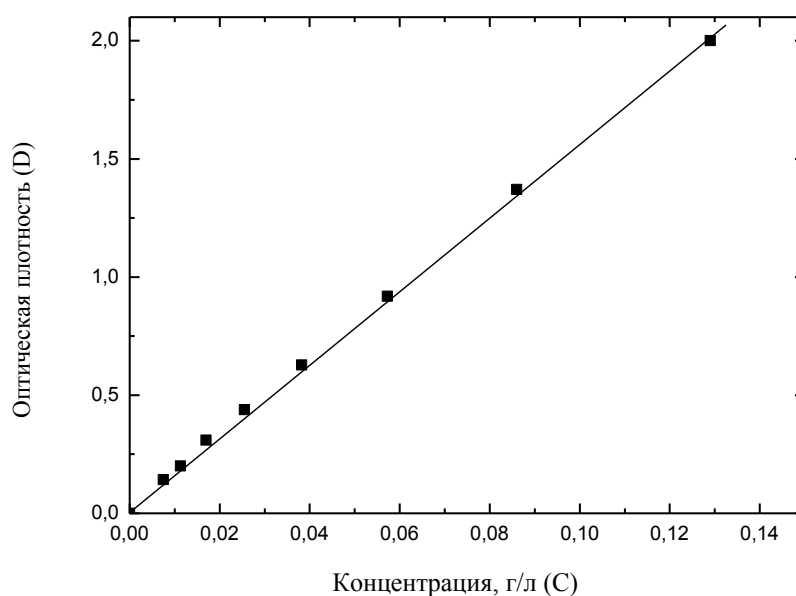


Рис. 23. Концентрационная зависимость оптической плотности раствора производного C_{60} с L - треонином

Значения натуральных коэффициентов экстинкции для определения концентрации производного фуллерена C_{60} и производного фуллерена C_{70} с L-треонином по оптической плотности на длине волны 330 нм составили 0,031 и 0,043 соответственно.

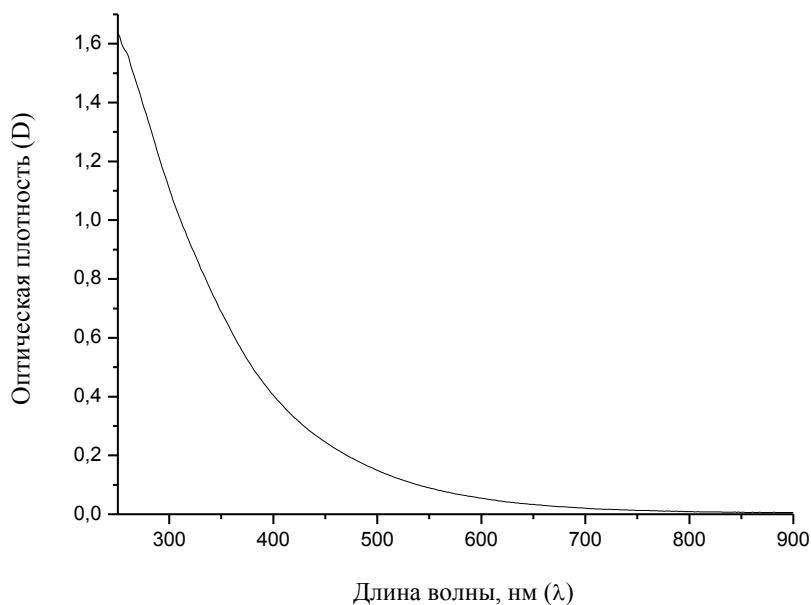


Рис. 24. Спектр электронного поглощения раствора производного C_{70} с L - треонином

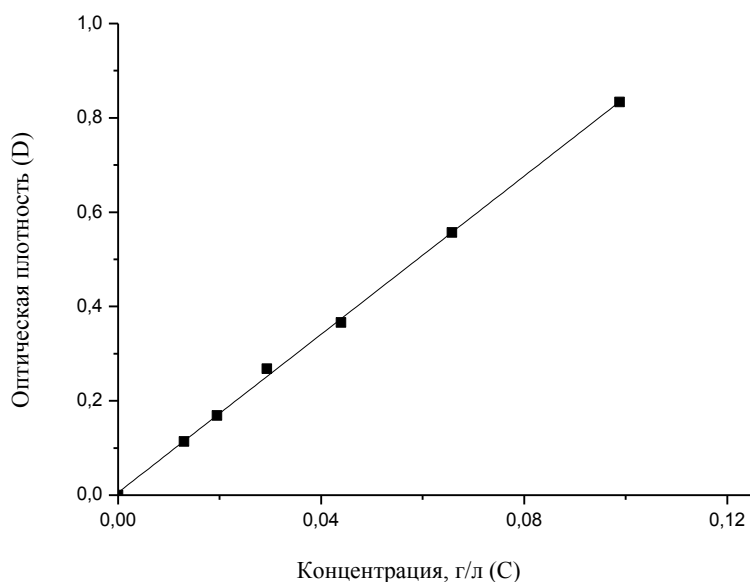


Рис. 25. Концентрационная зависимость оптической плотности раствора производного C_{70} с L – треонином

Таким образом, основываясь на полученных данных, был разработан спектрофотометрический метод определения производных легких фуллеренов с L-треонином в жидких растворах.

3.2 Исследование свойств производных легких фуллеренов с L-треонином

3.2.1 Объемные свойства водных растворов производных легких фуллеренов с L-треонином при 25 °С

Концентрационные зависимости плотности и среднего молярного объема водных растворов производного фуллерена C_{60} с L-треонином представлены на рисунках 26, 27.

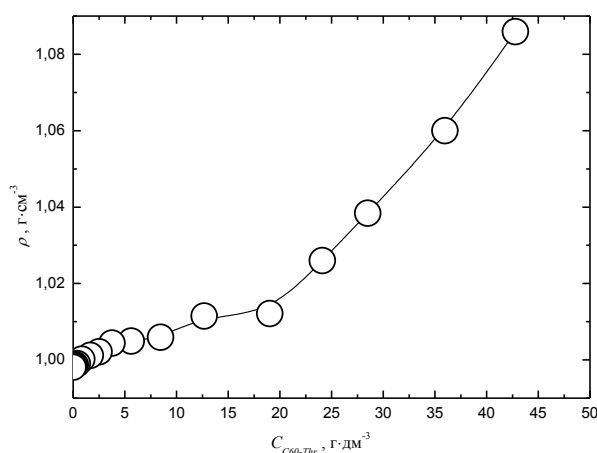


Рис. 26. Концентрационная зависимость плотности водных растворов производного C_{60} с L-треонином при 25°С

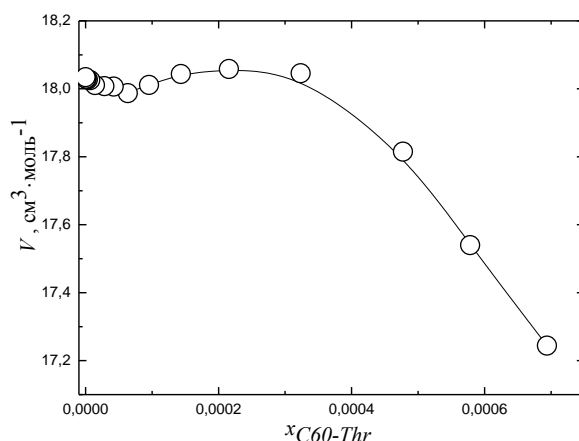


Рис. 27. Концентрационная зависимость среднего молярного объема водных растворов производного C_{60} с L-треонином при 25°С

Также были получены концентрационные зависимости (рис. 28, рис. 29) парциальных молярных объемов компонентов бинарных растворов.

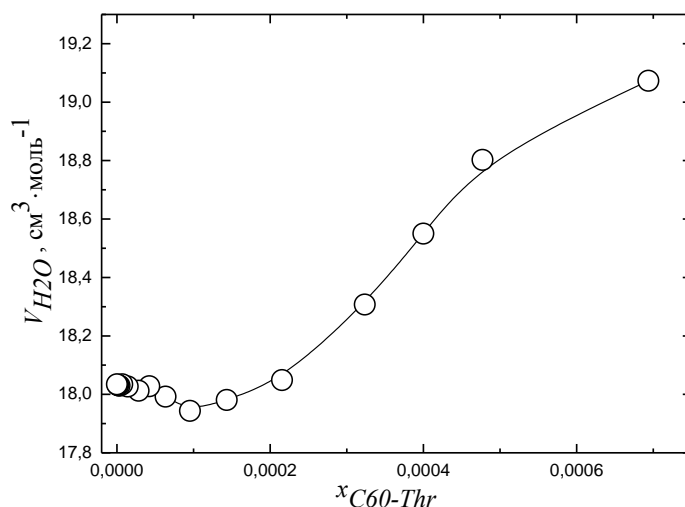


Рис. 28. Концентрационная зависимость парциального молярного объема H_2O в растворе при 25°C

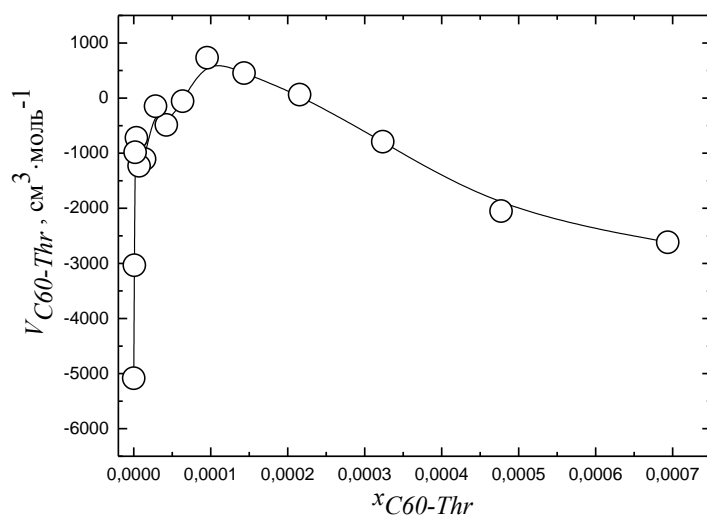


Рис. 29. Концентрационная зависимость парциального молярного объема производного C_{60} с L-треонином в растворе при 25°C

Высокие абсолютные значения парциальных молярных объемов производного C_{60} с L-треонином в области низких концентраций показывают, что даже небольшие доли этого соединения вызывают структурирование раствора. Этот факт свидетельствует о том, что молекулы рассматриваемого соединения естественно

вкладываются в структуру раствора и занимают объем, соответствующий их электронной структуре.

3.2.2 Удельная и молярная рефракции водных растворов производных легких фуллеренов с L-треонином

Экспериментальные данные по показателям преломления водных растворов C_{60} -L-треонина представлены на рисунке 30. Согласно расчетным значениям удельной (γ) и молярной (R) рефракций, найденным по формулам 10, 11 соответственно, получены их концентрационные зависимости (рис. 31, рис. 32).

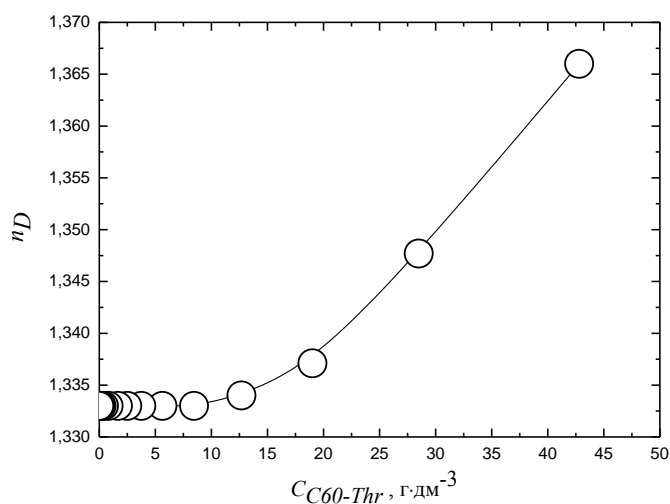


Рис. 30. Концентрационная зависимость показателя преломления водных растворов производного C_{60} с L - треонином при 25 °С

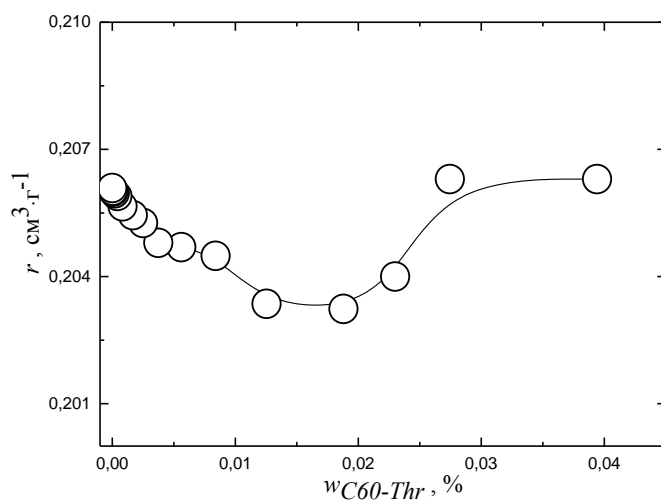


Рис. 31. Концентрационная зависимость удельной рефракции (r) водных растворов производного C_{60} с L - треонином при 25 °С. ω - массовая доля соединения в водном растворе

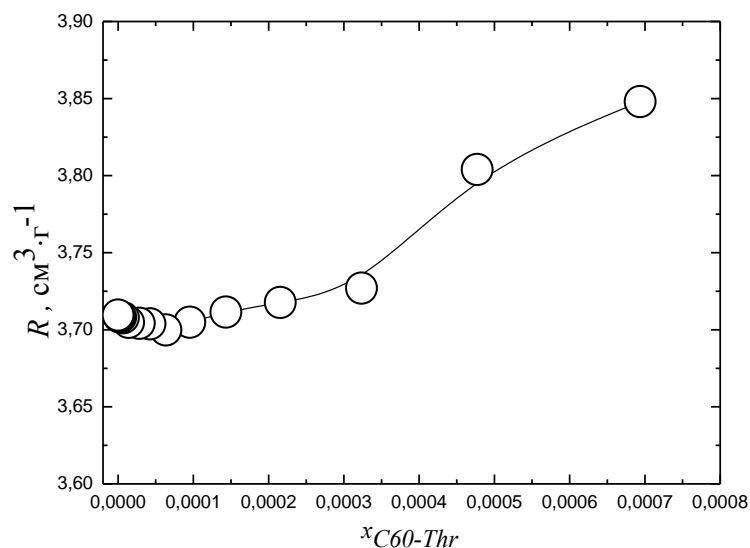


Рис. 32. Концентрационная зависимость молярной рефракции (R) водных растворов производного C_{60} с L - треонином при 25 °С; x - мольная доля соединения в водном растворе

Удельная и молярная рефракции также были определены по формулам 12, 13 согласно правилу аддитивности рефракций. Полученные концентрационные зависимости представлены на рисунках 33, 34.

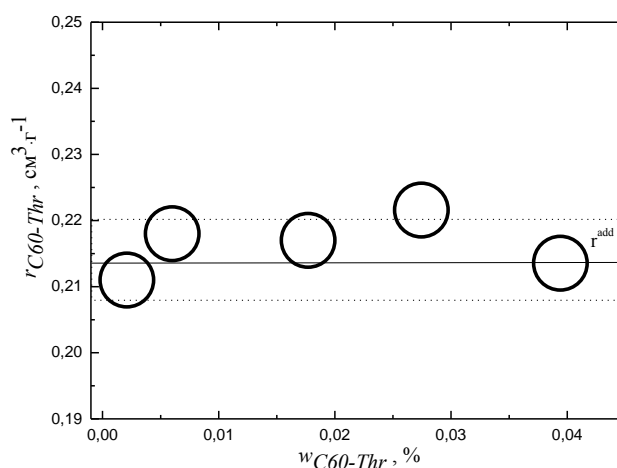


Рис. 33. Концентрационная зависимость удельной рефракции $[r_{C_{60}\text{-треонин}}]$ в водных растворах при 25 °С; ω - массовая доля производного C_{60} с L - треонином в водном растворе.

Значение молярной рефракции, найденное по правилу аддитивности Эйзенлора (14) составило $R^{\text{аддит.}} = 204 \pm 10 \text{ см}^3 \cdot \text{моль}^{-1}$. Удельная рефракция, рассчитанная по формуле 15, составила $0,213 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$. Таким образом, полученные значения хорошо согласуются с экспериментальными данными.

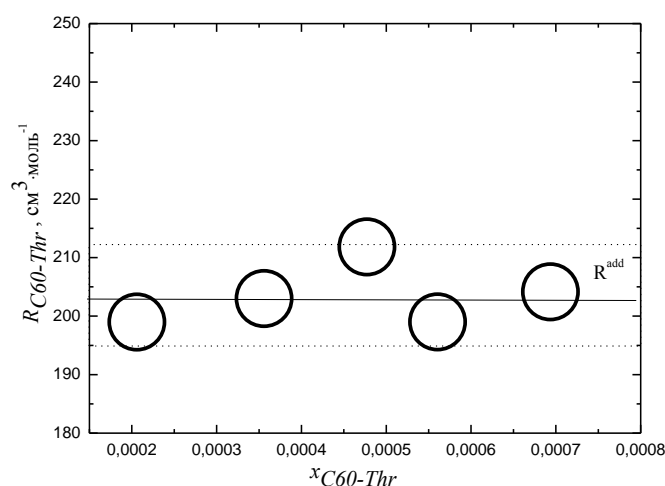


Рис. 34. Концентрационная зависимость молярной рефракции $[R_{C_{60}\text{-треонин}}]$ в водных растворах при 25 °С; x - мольная доля производного C_{60} с L - треонином в водном растворе.

3.2.3 Политермическая растворимость производных легких фуллеренов с L-треонином в воде и температурная зависимость плотности насыщенных растворов

Температурные зависимости по плотности насыщенных растворов и растворимости производного C_{60} с L - треонином представлены на рисунках 35 и 36 соответственно.

Политерма растворимости содержит одну нонвариантную точку проходного типа – точка О на рисунке 36, отвечающая насыщению сразу 2-мя твердыми фазами – кристаллогидратом и безводным бис-аддуктом. Как видно из рисунка, растворимость соединения весьма значительна и составляет от десятков до сотен г/л.

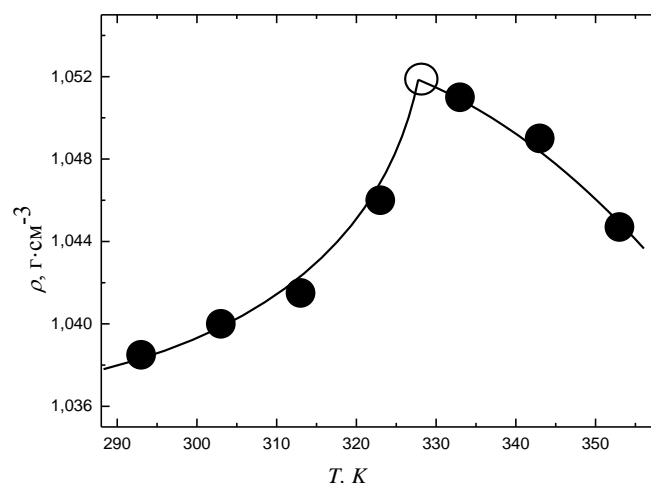


Рис. 35. Плотность насыщенных растворов ρ в бинарной системе производное фуллерена C_{60} с L-треонином - H_2O

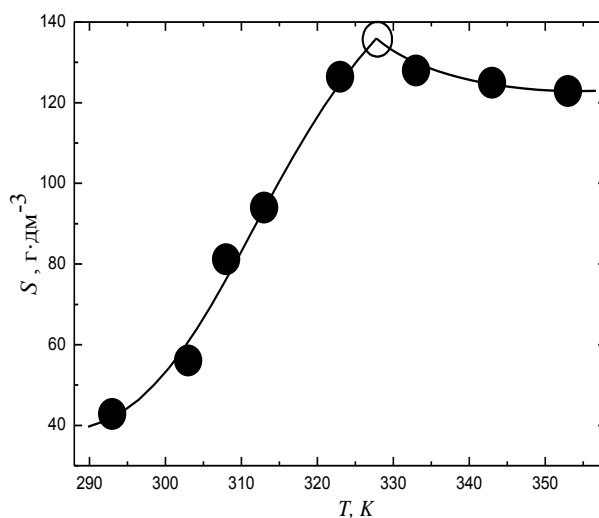


Рис. 36. Растворимость насыщенных растворов S в бинарной системе производное фуллерена C_{60} с L-треонином – H_2O

3.2.4 Изучение концентрационной зависимости электропроводности водных растворов производных легких фуллеренов с L-треонином. Расчет кажущейся степени диссоциации, концентрационных и термодинамической констант диссоциации

Расчетные данные по удельной и молярной электропроводности водных растворов производного C_{60} с L-треонином, кажущейся степени и константе диссоциации представлены в таблице 7.

Таблица 7. Расчетные данные по изучению электропроводности производного C_{60} с L-треонином

C (г·дм ⁻³)	M (моль·дм ⁻³)	α	k (См·см ⁻³)	λ (См·см ² ·моль ⁻¹)	pK_D
0	0	1,00	0,00	420	4,73
0,1094	$1,14 \cdot 10^{-4}$	0,84	$5,14 \cdot 10^{-5}$	355	4,43
0,2188	$2,29 \cdot 10^{-4}$	0,78	$9,29 \cdot 10^{-5}$	329	4,24
0,4375	$4,58 \cdot 10^{-4}$	0,72	$4,58 \cdot 10^{-4}$	306	3,61
0,875	$9,15 \cdot 10^{-4}$	0,66	$9,15 \cdot 10^{-4}$	277	3,39
1,75	$1,83 \cdot 10^{-3}$	0,57	$1,83 \cdot 10^{-3}$	242	3,21
2,50	$2,62 \cdot 10^{-3}$	0,56	$3,22 \cdot 10^{-3}$	239	2,97
5,00	$5,23 \cdot 10^{-3}$	0,53	$6,73 \cdot 10^{-3}$	224	2,71

Определено значение термодинамическая константы диссоциации:

$$pK_D^{\text{терм.}} = 4.87 \quad (26)$$

Таким образом, $K_D^{\text{терм.}} \approx 1,35 \cdot 10^{-5}$. То есть в водных растворах соединение проявляет себя как слабый электролит.

3.2.5 Определение размеров ассоциатов производных легких фуллеренов с L-треонином в воде методом динамического светорассеяния

Экспериментальные данные по определению размеров ассоциатов производных легких фуллеренов с L-треонином представлены в таблицах 8, 9 и на рисунках 37, 38.

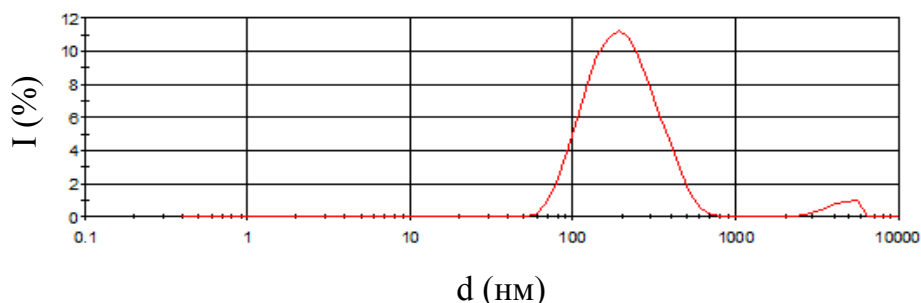


Рис. 37. Распределение по размерам наночастиц производного C_{60} с L-треонином в водных растворах при концентрации 1 г·дм⁻³; I – интенсивность (%), d – размер ассоциатов (нм)

Таблица 8. Размеры ассоциатов производного C_{60} с L-треонином в воде при температуре 25°C

C , $г \cdot дм^{-3}$	d_0 , нм	d_I , нм	d_{II} , нм	d_{III} , нм	$N_{0 \rightarrow 2}$	$N_{0 \rightarrow 3}$	$N_{2 \rightarrow 3}$
0	2	-	-	-	-	-	-
0,01	-	-	200	-	$3 \cdot 10^5$	-	-
0,1	-	-	200	-	$3 \cdot 10^5$	-	-
1,0	-	-	200	5000	$3 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^9$	$8 \cdot 10^3$
5	-	-	200	5000	$3 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^9$	$8 \cdot 10^3$
10	-	-	200	5000	$3 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^9$	$8 \cdot 10^3$

где d_i – линейный размер кластеров i порядка, $N_{0 \rightarrow 2}, N_{0 \rightarrow 3}$ – среднее число мономеров в кластере II и III порядков, $N_{2 \rightarrow 3}$ – среднее число кластеров II порядка в кластерах III порядка.

Также таблицы 8, 9 содержат значения $N_{i/i+1}$ (среднее число ассоциатов i -го порядка в ассоциате $i+1$ порядка).

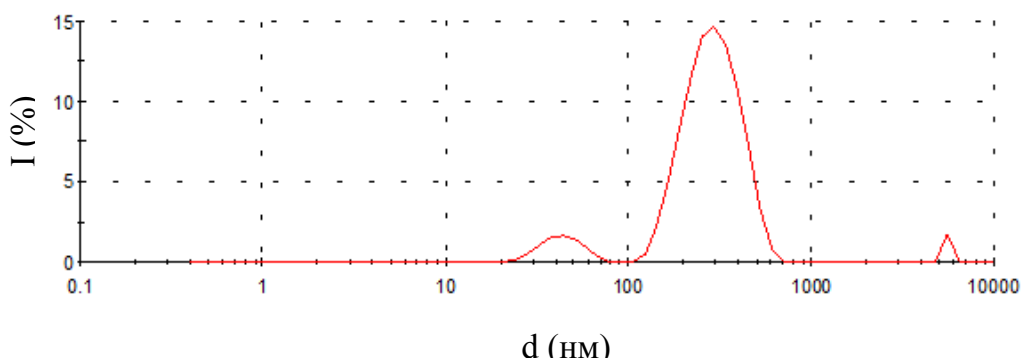


Рис. 38. Распределение по размерам наночастиц производного C_{70} с L-треонином в водных растворах при концентрации $1 г \cdot дм^{-3}$; I – интенсивность (%), d – размер ассоциатов (нм)

Таблица 9. Размеры ассоциатов производного C₇₀ с L-треонином в воде при температуре 25°C

C, г · дм ⁻³	d ₀ , нм	d _I , нм	d _{II} , нм	d _{III} , нм
0	2	-	-	-
0,001	-	-	200	5000
0,01	-	-	200	5000
0,1	-	-	200	5000
0,2	-	-	200	5000
0,3	-	-	200	5000
0,4	-	-	200	5000
0,5	-	-	200	5000
1	-	40	200	5000
3	-	40	-	-

Таким образом, из полученных данных можно сделать следующие заключения:

- 1) Мономерных форм нанокластеров, точнее их гидратов (с —диаметром квазисферы d₀ ~ 2 ± 0,2 нм) не обнаружено даже в самых разбавленных растворах при концентрации C = 0,01 г/л
- 2) В диапазоне исследуемых концентраций также не обнаружено ассоциатов I-го порядка в растворах производного C₆₀ с L-треонином. В растворах производного фуллерена C₇₀ с L-треонином ассоциаты I-го порядка образуются при концентрациях от 1 г·дм⁻³
- 3) В растворах производного C₆₀ с L-треонином установлено образование ассоциатов двух типов: второго порядка с линейным размером 200 нм и третьего порядка с линейным размером 5000 нм. В растворах производного фуллерена C₇₀ с L-треонином установлено образование ассоциатов трех типов.

3.2.6 Исследование поверхностных явлений в водных растворах производного легкого фуллерена C₇₀ с L-треонином

Пример кинетической зависимости изменения поверхностного натяжения в растворе производного фуллерена C₇₀ с L-треонином с концентрацией 0,1 г/л представлен на рисунке 39.

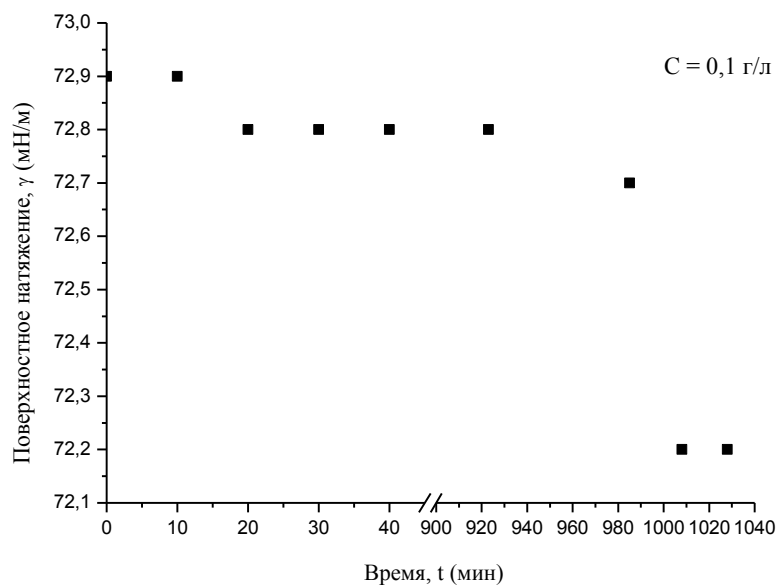


Рис. 39. Кинетическая зависимость изменения поверхностного натяжения в растворе производного фуллерена C_{70} с L-треонином с концентрацией 0,1 г/л

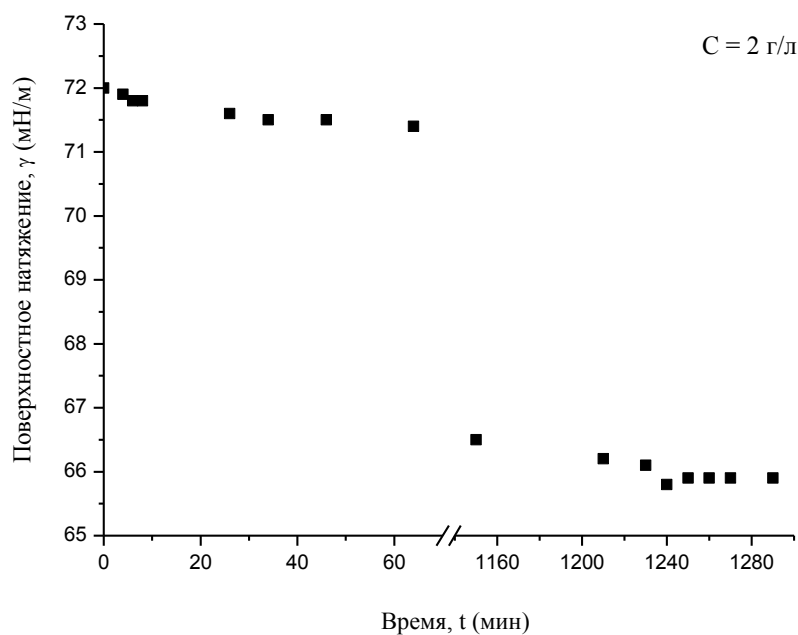


Рис. 40. Кинетическая зависимость изменения поверхностного натяжения в растворе производного фуллерена C_{70} с L-треонином с концентрацией 2 г/л

В водном растворе с концентрацией производного фуллерена C_{70} с L-треонином в количестве 1 г/л не наблюдалось проявления поверхностной активности в течение 16 часов. В это время поверхностное натяжение совпадало со значением для

чистой воды в пределах погрешности ($\pm 0,5$ мН/м) и составляло около 72,8 мН/м. Далее наблюдалось небольшое уменьшение поверхностного натяжения до 72,2 мН/м.

Для концентрированного раствора производного фуллерена C_{70} с L-треонином (2 г/л) наблюдалось более интенсивное уменьшение поверхностного натяжения после образования поверхности (рис. 40).

Изотерма поверхностного натяжения представлена на рисунке 41.

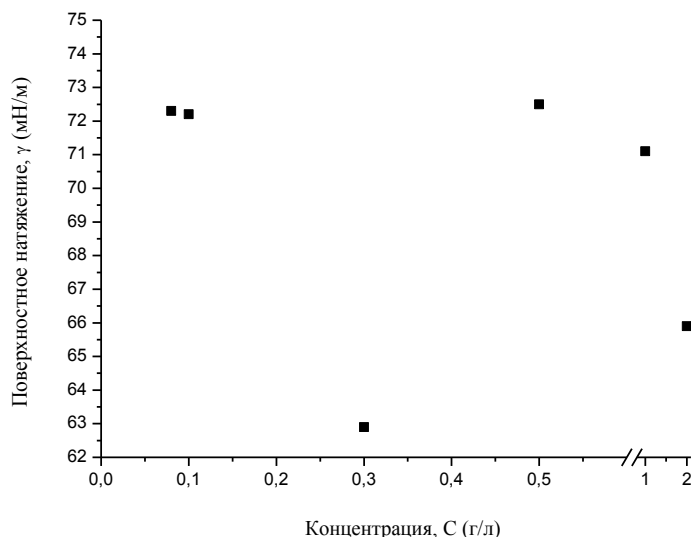


Рис. 41. Изотерма поверхностного натяжения растворов производного фуллерена C_{70} с L-треонином

Из графика видно, что с ростом концентрации производного фуллерена C_{70} с L-треонином наблюдается тенденция к уменьшению поверхностного натяжения. Однако, при концентрации соединения 0,3 г/л происходило значительное уменьшение поверхностного натяжения, что было подтверждено в повторном эксперименте.

Длительный период индукции кинетических зависимостей поверхностных свойств может указывать на то, что адсорбционный слой не является однородным и может содержать отдельных молекулы производных фуллерена. В то же время медленные изменения свойств поверхности указывают на то, что кинетика адсорбции не контролируется диффузией от объемной фазы к поверхности.

Изображения, полученные с помощью микроскопа при угле Брюстера представлены на рисунке 42. Таким образом, можно наблюдать образование пленки, на поверхности растворов C_{70} - L-треонина.

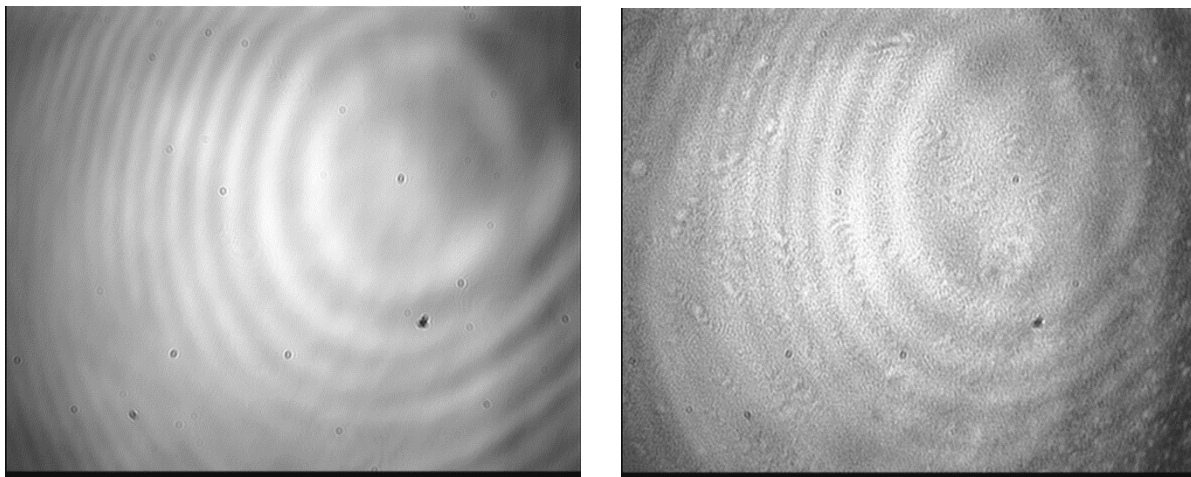


Рис. 42. Изображение поверхности воды (слева) и поверхности водного раствора производного фуллерена C_{70} с L-треонином с концентрацией 2 г/л

Также были получены AFM-изображения пленок производного фуллерена C_{70} с L-треонином, полученных методом Шайфера. Например, на рисунке 43 представлено изображение пленки, полученной из раствора с концентрацией 0,001 г/л. Таким образом, было установлено образование ассоциатов с размером 1-5, - 3,5 нм.

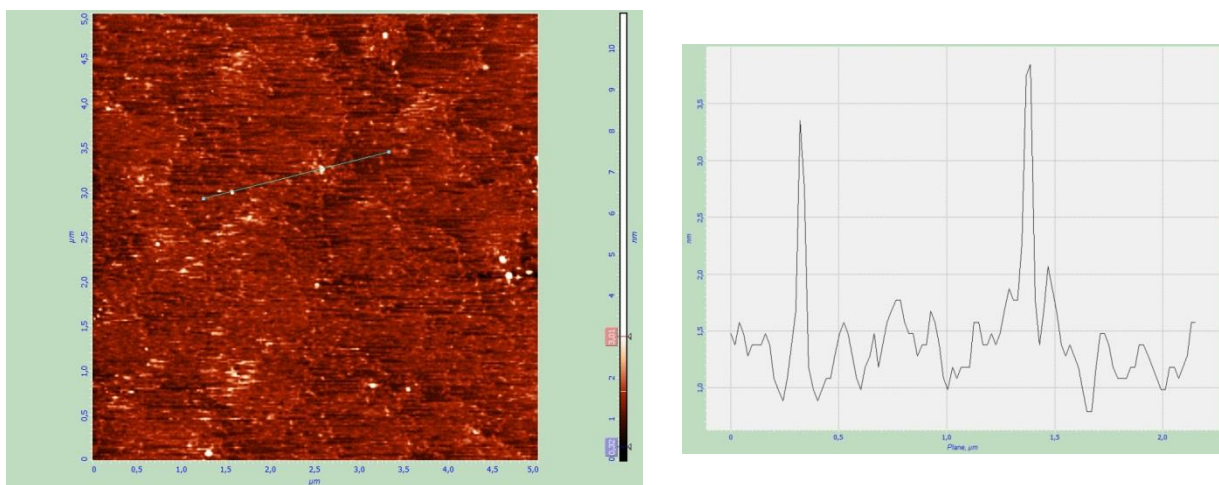


Рис. 43. Изображение пленки производного фуллерена C_{70} с L-треонином

3.2.7 Изучение цитотоксичности и противоопухолевой активности производных легких фуллеренов с L - треонином на примере C_{60} -L-треонина

Методом МТТ была проведена оценка цитотоксичности C_{60} -L-треонина на модели клеток линии *HEK 29* (рис. 44). Было установлено, что культивирование клеток линии *HEK 293* с производным фуллерена C_{60} с L-треонином в концентрационном диапазоне от 0.1 до 100 мкмоль/л не вызывает токсического

эффекта. Более того, изучаемое соединение оказывает стимулирующее действие на пролиферацию клеток этой линии.

Также был проведен анализ противоопухолевой активности производного фуллерена C_{60} с L-треонином на модели опухолевых клеток глиобластомы человека (A172) и карциномы легкого человека (A549) методом МТТ. Таким образом, было обнаружено, что соединение обладает слабой противоопухолевой активностью: в диапазоне концентраций 0.1-10.0 мкМ вызывает умеренное снижение (до 23%) интенсивности деления клеток опухолевой линии A172 (рис. 45.) по сравнению с контролем (т.е. в отсутствии производного фуллерена C_{60} с L-треонином).

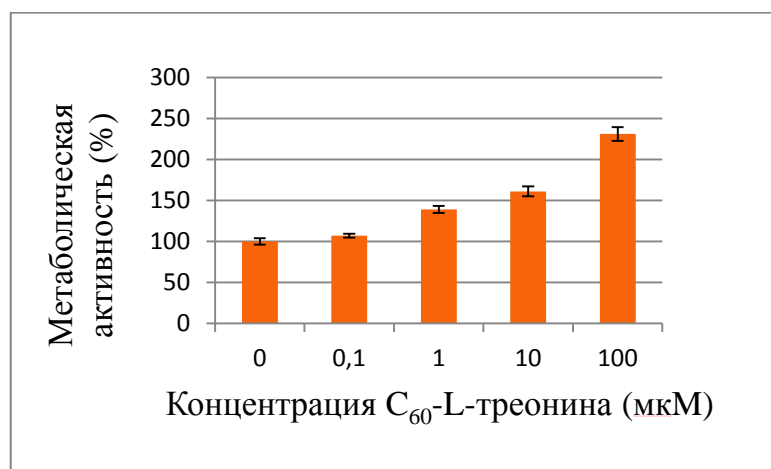


Рис. 44. Цитотоксичность производного фуллерена C_{60} с L-треонином

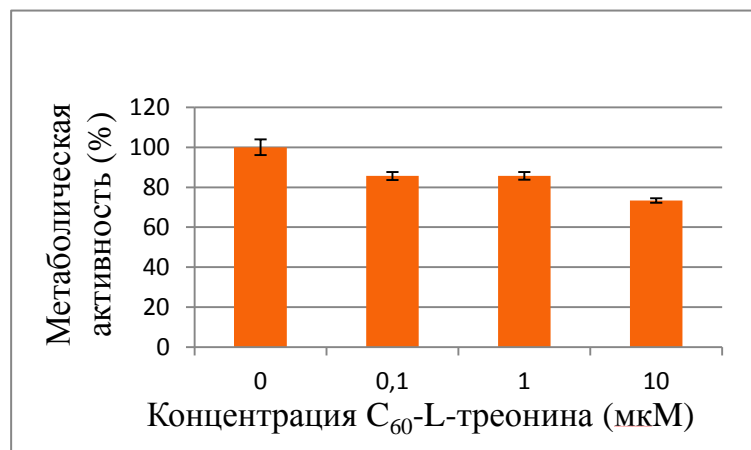


Рис. 45. Оценка противоопухолевой активности производного фуллерена C_{60} с L-треонином на модели клеток линии A172

По результатам аналогичного эксперимента (рис. 46), на модели клеток опухолевой линии A549, подтверждено, что производное фуллерена C_{60} с L-треонином обладает слабой противоопухолевой активностью: в диапазоне концентраций 1-10 мкМ. Соединение не ингибирует деление клеток опухолевой

линии A549. При действии 1000 мкМ отмечено умеренное снижение интенсивности деления клеток.

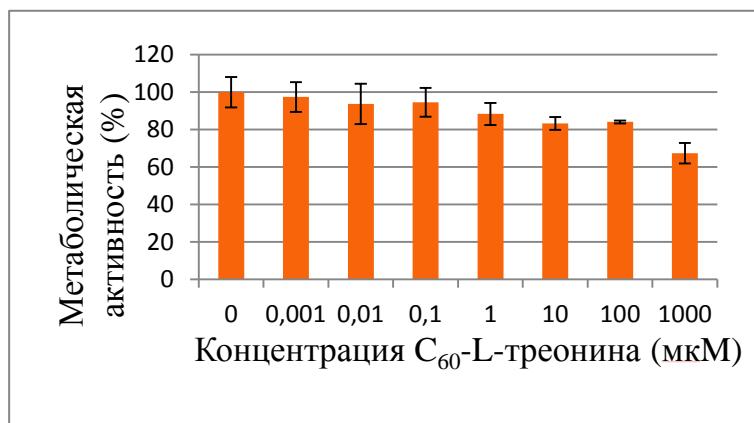


Рис. 46. Оценка противоопухолевой активности производного фуллерена C₆₀ с L-треонином на модели клеток линии A549

3.2.8 Изучение влияния производного C₆₀ с L-треонином на гемолиз эритроцитов крови человека спектрофотометрическим методом

Экспериментальные данные по оценке влияния производного C₆₀ с L-треонином на гемолиз эритроцитов представлены на рисунке 47.

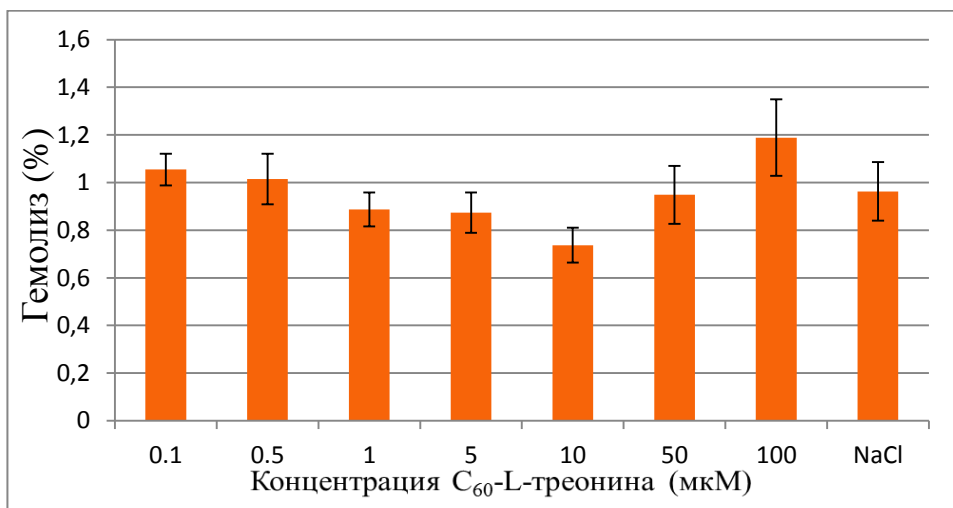


Рис. 47. Оценка влияния производного C₆₀ с L-треонином на гемолиз эритроцитов

Если процент гемолиза меньше 5%, тестируемые объекты могут рассматриваться как безопасные [148].

Установлено, что исследуемое соединение не вызывает гемолиз эритроцитов по сравнению с контролем (изотонический раствор NaCl).

3.2.9 Влияние производного фуллерена C₆₀ с L-треонином на качественные характеристики семян *Lepidium sativum* (кресс-салат; с. «Ажур»)

Результаты экспериментов по оценке влияния производного фуллерена C₆₀ с L-треонином на качественные характеристики семян *Lepidium sativum* приведены в таблице 10. Было установлено, что соединения обладает выраженной биологической активностью. Обработка семян растворами производного фуллерена C₆₀ с L-треонином в концентрациях 1,0-25 мг/л воды не оказывала положительного влияния на рост растений на ранних этапах их онтогенеза, в концентрациях меньше 1,0 мг/л - не оказывала достоверного влияния и в концентрациях 100 мг/л и выше - обеспечивала снижение всхожести семян, длины корней или ростков.

Энергия проростания, определенная на третьи сутки после замачивания семян в растворах производного фуллерена C₆₀ с L-треонином показывает, что прорастание семян достоверно замедляется при всех его концентрациях, кроме 0,001 мг/л. Этот эффект имел кратковременный характер, так как уже к седьмым суткам показатели всхожести семян достоверно не отличались от контрольных. На основании полученных результатов была выбрана концентрация C₆₀-L-треонина 1,0 мг/л для введения его в корнеобитаемую среду растений при проведении вегетационных опытов.

3.2.10 Влияние производного фуллерена C₆₀ с L-треонином на показатели физиологического состояния и нетто-продуктивности *Hordeum vulgare* (яровой ячмень; с. Ленинградский)

Результаты экспериментов по оценке влияния производного C₆₀ с L-треонином на показатели физиологического состояния и нетто-продуктивности *Hordeum vulgare* приведены в таблице 11.

Было установлено, что присутствие производного C₆₀ с L-треонином в концентрации 1 мг/л способствует формированию листьев большей площади, для которых характерно также и более высокое содержание хлорофилла. В целом, эти данные свидетельствуют, что под влиянием производных фуллеренов формируется фотосинтетический аппарат, обладающий большими потенциальными возможностями фотосинтеза и накопления, в конечном итоге, сухого вещества в растениях. Внесение производных фуллерена в корнеобитаемую среду способствовало уменьшению индекса антоцианов у ячменя, что косвенно

свидетельствует об улучшении физиологического состояния растений и подтверждается увеличением значений показателей их роста. У растений под действием производных фуллеренов отмечается увеличение длины корней, «надземной части», числа стеблей и, как результат, общей биомассы и массы их органов: листьев, стеблей, корней – преимущественно на 24-100 %.

3.2.11 Изучение влияния производного фуллерена C_{60} с L – треонином на работу антиоксидантной системы *Hordeum vulgare* (яровой ячмень; с. Ленинградский)

Из экспериментальных данных (таблица 12) было установлено, что присутствие производного фуллерена C_{60} с L-треонином в питательном растворе способствует снижению интенсивности ПОЛ, увеличению активности СОД и при этом происходит активация генерации активных форм кислорода в листьях и корнях ячменя. Так, в вегетационных опытах показано, что при введении соединения в питательный раствор интенсивность ПОЛ в листьях ячменя снижалась на 20%, в корнях - на 7%; активность СОД достоверно не изменялась в листьях и на 17% увеличивалась в корнях, а содержание активных форм кислорода достоверно возрастает как в корнях, так и в листьях. Такие результаты предполагают вероятное использование активных форм кислорода в процессах конструктивного метаболизма и регуляции антиоксидантно-прооксидантного гомеостаза растений, а также, по всей видимости, об иммуномодуляторной роли препаратов.

Таблица 10. Влияние растворов производного фуллерена C₆₀ с аминокислотой треонин различной концентрации на качественные характеристики семян тестовой культуры кресс-салата сорта Ажур

концентрация водного раствора производного C ₆₀ с L-треонином, мг/л	энергия прорастания		всхожесть		длина ростка		длина корня	
	%	% к контролю	%	% к контролю	см	% к контролю	см	% к контролю
0 (вода)	61	100	70	100	3,9±0,3	100	5,5±0,5	100
0,001	58	95	72	103	4,1±0,5	105	5,4±0,5	98
0,01	46*	75*	69	99	4,0±0,4	103	5,5±0,7	100
0,1	36*	59*	67	96	4,4±0,6	113	5,6±0,8	102
1	35*	57*	69	99	4,6±0,4*	118*	5,9±0,7	107
10	39*	64*	74	106	4,7±0,5*	121*	6,4±0,6	116
25	39*	64*	74	106	4,7 ±0,3*	121*	6,2±0,7	113
50	30*	49*	66	94	4,4±0,3	113	6,0±0,6	109
100	27*	44*	62	89	3,9±0,3	100	5,6±0,5	102
500	22*	36*	52*	74*	3,0±0,4*	77*	4,0±0,6*	73*

Примечание: * - значение достоверно отличается от контроля на 5 %-ном уровне значимости

Таблица 11. Влияние производного C₆₀ с L-треонином ** на показатели физиологического состояния и нетто-продуктивности растений ярового ячменя с. Ленинградский (результаты двух вегетационных экспериментов)

варианты	показатели состояния растений						
	индексы содержания пигментов, отн.ед.		площадь листовой ассимилирующей поверхности, см ²	сухая масса растений			
	ChlRI	ARI		корни	стебли	листья	Общая
контроль, абс. значения	0,41 - 0,45	0,55- 0,72	168 - 374	0,10-0,19	0,24-0,25	0,35-0,41	0,69-0,85
фуллерен+ треонин, абс. значения	0,48*- 0,52*	0,41*- 0,55*	212*- 424*	0,20*-0,33*	0,41*-0,42*	0,48*-0,51*	1,06*-1,26*
фуллерен+ треонин, отклонение от контроля в %	+16* - +17*	-25* - - 24*	+13* - +26*	+74*- 100*	+68*- 71*	+24*-37*	+48*-+54*
треонин, абс. значения	0,47*- 0,49	0,51 - 0,57*	154- 209*	0,19*- 0,24*	0,25-0,29*	0,36-0,42	0,84*-0,92
треонин, отклонение от контроля в %	+9 - +15*	-21* - -7	-44* - -8	+26*-+90*	+4-+16*	+2-+3	+8-+22*

Примечание: ** - представлены диапазоны средних значений показателей роста, развития, урожайности ярового ячменя в двух вегетационных экспериментах в регулируемых условиях; * - значения достоверно отличается от контрольного на 5%-ном уровне значимости

Таблица 12. Показатели функционирования антиоксидантной системы растений ярового ячменя с. Ленинградский, выращиваемых в присутствии производного C₆₀ с L-треонина в питательном растворе при искусственном освещении

показатели	листья			корни		
	контроль	производное фуллерена C ₆₀ с L-треонином		контроль	производное фуллерена C ₆₀ с L-треонином	
		абс. значения	откло- нение от контроля, в %		абс. значения	откло- нение от контроля, в %
ПОД, мМ/г	0,0065	0,0052*	-20*	0,0069	0,0064	-7
СОД, отн. ед.	1,0680	1,0770	+1	1,0770	1,2635*	+17*
АФК, отн. ед.	3,3300	6,2300*	+87*	0,3300	1,03*	+212*

Примечание: * - значения достоверно отличается от контрольного на 5%-ном уровне значимости

Результаты и выводы

1. Разработаны методики синтеза водорастворимых аддуктов легких фуллеренов (C_{60} и C_{70}) с L-треонином и проведена идентификация полученных соединений с помощью комплекса физико-химических методов (ВЭЖХ, ИК- и УФ-спектроскопия, термогравиметрия, элементный анализ).

2. Изучены физико-химические свойства растворов бинарной системы производное C_{60} с L-треонином – вода. Показано, что разбавленные водные растворы синтезированного соединения при низких концентрациях имеют высокие абсолютные значения парциальных молярных объемов, что свидетельствует о сильном структурировании таких растворов. Установлено выполнение правил аддитивности для удельных и молярных рефракций растворов производного C_{60} с L-треонином. Показано, что аддукт фуллерена C_{60} с L-треонином в водных растворах является слабым электролитом (термодинамическая константа диссоциации составляет $1,35 \cdot 10^{-5}$ отн. ед.). В водных растворах молекулы производных фуллеренов C_{60} и C_{70} с L-треонином сильно ассоциированы (размеры ассоциатов составляют от сорока до пяти тысяч нм в диапазоне концентраций 0,01-10 г/л).

3. Изучена диаграмма растворимости бинарной системы производное C_{60} с L-треонином – вода в интервале температур 20-80 °С, установлен состав равновесного кристаллогидрата, показана хорошая совместимость аддукта фуллерена C_{60} с L-треонином с водой (десятки и сотни г/л).

4. Исследовано влияние производного C_{60} с L-треонином на цитотоксичность и пролиферацию клеток почечного эпителия человека (*HEK293*), а также опухолевых клеток человека. Показано, что введение аддукта фуллерена C_{60} с L-треонином в концентрационном диапазоне от 0,1 до 100 мкМ не вызывает токсического эффекта в отношении клеток *HEK293*, но приводит к гибели опухолевых клеток карциномы легкого и глиобластомы человека. Также обнаружено, что исследуемое соединение не вызывает гемолиз эритроцитов человека и может рассматриваться как безопасное.

5. Изучено влияние производного C_{60} с L-треонином на физиолого-биохимические характеристики растений. Установлено, что у растений под действием исследуемого соединения отмечается увеличение длины корней, «надземной части», числа стеблей и, в конечном итоге, общей биомассы и массы их органов: листьев,

стеблей, корней – преимущественно на 24-100 %. Таким образом, производное фуллерена C_{60} с L-треонином в концентрации 1 мг/л оказывает ростстимулирующий эффект на растения на протяжении онтогенеза, обусловленный положительным влиянием на эффективность работы их фотосинтетического аппарата, а также антиоксидантных систем.

Благодарности

Исследования физико-химических свойств и биологической активности производных легких фуллеренов с L-треонином, идентификация полученных соединений были проведены с использованием оборудования ресурсных центров «Геомодель», «Методы анализа состава вещества», «Инновационные технологии композитных наноматериалов», «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ, а также при сотрудничестве с ФГБНУ «Агрофизический научно-исследовательский институт».

Список цитированной литературы

1. Jones D. E. H. Hollow molecules //New Sci. – 1966. – Т. 32. – С. 245
2. Barth W. E., Lawton R. G. Dibenzo [ghi, mno] fluoranthene //Journal of the American Chemical Society. – 1966. – Т. 88. – №. 2. – С. 380-381.
3. Osawa E. Superaromaticity //Kagaku. – 1970. – Т. 25. – №. 854. – С. 101.
4. Сидоров, Л. Н. Фуллерены / Л. Н. Сидоров, М. А. Юровская, А. Я. Борщевский, И. В. Трушков, И. Н. Иоффе. – Москва: Изд-во «Экзамен», 2005. – 688 с.
5. Бочвар Д.А., Гальперин Е.Г. О гипотетических системах: карбододекаэдре, s-икосаэдрани и карбо-s-икосаэдре // Докл. АН СССР. сер. Химия. 209(3), 610-612 (1973).
6. Мастеров В.Ф. Физические свойства фуллеренов // Соросовский Образовательный Журнал. 1997. N 1. С. 92-99.
7. Davidson R. A. Spectral analysis of graphs by cyclic automorphism subgroups // Theoretica chimica acta. – 1981. – Т. 58. – №. 3. – С. 193-231.
8. Rohlfing E. A., Cox D. M., Kaldor A. Production and characterization of supersonic carbon cluster beams //The Journal of chemical physics. – 1984. – Т. 81. – №. 7. – С. 3322-3330.
9. Kroto H. W., Heath J. R., O'Brien S. C., Curl R. F., Smalley R. E. C60: Buckminsterfullerene // Nature. 318, 162-163 (1985).
10. Qian W., Bartberger, M. D., Pastor, S. J., et al. C62, a non-classical fullerene incorporating a four-membered ring //Journal of the American Chemical Society. – 2000. – Т. 122. – №. 34. – С. 8333-8334.
11. Tan Y. Z., Chen, R. T., Liao, Z. J., et al. Carbon arc production of heptagon-containing fullerene [68] //Nature communications. – 2011. – Т. 2. – С. 420.
12. Fowler P. W., Manolopoulos D. E. An atlas of fullerenes //Clarendon, Oxford. – 1995. – 392 p.
13. Aihara J. Bond resonance energy and verification of the isolated pentagon rule //Journal of the American Chemical Society. – 1995. – Т. 117. – №. 14. – С. 4130-4136.
14. Kobayashi K., Nagase S., Yoshida M., Osawa E. Endohedral metallofullerenes. Are the isolated pentagon rule and fullerene structures always satisfied? // J. Am. Chem. Soc. – 1997. – V. 119. – P. 12693-12694.

15. Takata M., Nishibori E., Sakata M., et al. Sc₂ dimer in IPR-violated C₆₆ fullerene: a covalent bonded metallofullerenes // Chem. Phys. Lett. – 2003. – V. 372. – P. 512-518.
16. Wang C., Kai T., Tomiyama T., et al. C₆₆ fullerene encaging a scandium dimer // Nature. – 2000. – V. 408. – P. 426-427.
17. Beavers C. M., Chaur M. N., Olmstead M. M. et al. Large Metal Ions in a Relatively Small Fullerene Cage: The Structure of Gd₃N@ C₂ (22010)-C₇₈ Departs from the Isolated Pentagon Rule // Journal of the American Chemical Society. – 2009. – T. 131. – №. 32. – C. 11519-11524.
18. Johnson R. D., Bethune D. S., Yannoni C. S. Fullerene structure and dynamics: a magnetic resonance potpourri // Acc. Chem. Res. – 1992. – V.25. – P. 169-175.
19. Bühl M., Hirsch A. Spherical aromaticity of fullerenes // Chemical Reviews. – 2001. – T. 101. – №. 5. – C. 1153-1184.
20. Tycko R. Haddon, R. C., Dabbagh, G., et al. Solid-state magnetic resonance spectroscopy of fullerenes // The Journal of Physical Chemistry. – 1991. – T. 95. – №. 2. – C. 518-520.
21. Hedberg K., Hedberg L., Buhl M., et al. Molecular structure of free molecules of the fullerene C₇₀ from gasphase electron diffraction // J. Am. Chem. Soc. – 1997. – V. 119. – P. 5314- 5329.
22. Зверев, В. В. Анализ структуры фуллерена C₇₀ квантово-химическими методами / В. В. Зверев, В. И. Коваленко // Ж. физ. хим. – 2006. – Т.80. – № 1. – С. 110-116.
23. Huffman D. R., Kratschmer W. Lamb L.D., Fostiropoulos K. // Nature (London). – 1990. – T. 347. – C. 354.
24. Kikuchi K., Suzuki S., Ikemoto I., Achinami Y. C₈₂ carbon cluster and its production // Патент Японии JP 05,058,609. C01B31/00 (09.03.93).
25. Удовицкий В. Г., Кропотов А. Ю., Фареник В. И. Развитие плазменных методов синтеза фуллеренов // Физическая инженерия поверхности. – 2012.
26. Ikeda T., Ogura T. Method and device for producing fullerene // Патент Японии JP 05,238,717. C01B31/02 (17.09.93).
27. Sumino S. Method for producing C₆₀ // Патент Японии JP 5,004,810. C01B31/02 14.01.93.
28. Irie T., Murata K., Matsumoto M., Natsuta M. Production of fullerenes // Патент Японии JP 6,032,606. C01B31/02 (08.02.94).

29. Armines F. Manufacture of fullerenes, and the products obtained // Патент Франции FR 2,710,049. C01B31/00 (24.03.95).
30. Трошин П. А. и др. Функциональные производные фуллеренов: методы синтеза и перспективы использования в органической электронике и биомедицине //Иваново: Издательство «Ивановский государственный университет. – 2008.
31. Keesmann T., Grosse-Wilde H. Process and apparatus for manufacturing fullerenes, especially pentagonal and/or hexagonal rings // Европейский патент EP 646, 644. C01B31/02 (05.04.95).
32. Bunshah R. F., Jou S., Prakash S. et al. Fullerene formation in sputtering and electron beam evaporation processes //The Journal of Physical Chemistry. – 1992. – Т. 96. – №. 17. – С. 6866-6869.
33. Howard J. B., McKinnon, J. T., Makarovsky Y. et al. Fullerenes C (60) and C (70) in Flames //Nature. – 1991. – Т. 352. – №. 6331. – С. 139.
34. Taylor R., Langley, G. J., Kroto, H. W., et al. Formation of C60 by pyrolysis of naphthalene //Nature. – 1993. – Т. 366. – №. 6457. – С. 728-731.
35. Патент РФ № 2550891 «Способ разделения фуллеренов» Блохин А. А., Чарыков Н. А., Мурашкин Ю.В., Кескинова М. В., Кескинов В. А.
36. Патент США N 5227038 «Electric arc process for making fullerenes» R. E. Smalley, R. E. Haufler, 1993.
37. Патент РФ № 2124473 «Способ извлечения фуллеренов» Москалев П.Н.; Грушко Ю.С.; Седов В.П. Россия, 1999.
38. Lorents D. C., Malhotra R. Process and apparatus for producing and separating fullerenes // Патент США US 5,304,366. C01B31/02 (19.04.94).
39. Лаухина, Е. Э. Экстракция фуллерена C60 из фуллеренсодержащих углеродных саж/ Е. Э. Лаухина, В. П. Бубнов / Изв. АН, сер. Химическая. –1995. – № 7. – С.1223-1225.
40. Патент США N 5227038 «Electric arc process for making fullerenes» R. E. Smalley, R. E. Haufler, 1993.
41. Diederich F., Ettl R., Rubin Y., et al. The Higher Fullerenes: Isolation and Characterization of C76, C84, C90, C94, and C70O, an Oxide of D5h-C70 // Science. – 1991. – V. 252, № 5005. – P. 548-51.

42. Scrivens W. A., Rawlett A. M., Tour J. M. Preparative Benchtop Enrichment of C₆₀, C₇₀, and the Higher Fullerene Allotropes Using a Brominated Polystyrene Stationary Phase // J. Org. Chem. – 1997. – V. 62, N.8. – P. 2310-2311.
43. Heath J. R., O'brien, S. C., Zhang, Q., et al. Lanthanum complexes of spheroidal carbon shells //Journal of the American Chemical Society. – 1985. – T. 107. – №. 25. – C. 7779-7780.
44. Ebbesen T. W., Tabuchi J., Tanigaki K. The mechanistics of fullerene formation //Chemical physics letters. – 1992. – T. 191. – №. 3-4. – C. 336-338.
45. Kroto H. Space, stars, C₆₀, and soot //Science. – 1988. – T. 242. – №. 4882. – C. 1139.
46. Baum R. M. Ideas on soot formation spark controversy //Chemical and Engineering News. – 1990. – T. 68. – C. 30-32.
47. Frenklach M., Ebert L. B. Comment on the proposed role of spheroidal carbon clusters in soot formation //The Journal of Physical Chemistry. – 1988. – T. 92. – №. 2. – C. 561-563.
48. Smalley R. E. Self-assembly of the fullerenes //Accounts of Chemical Research. – 1992. – T. 25. – №. 3. – C. 98-105.
49. Chang T. M., Naim, A., Ahmed, S. N., et al. On the mechanism of fullerene formation. Trapping of some possible intermediates //Journal of the American Chemical Society. – 1992. – T. 114. – №. 19. – C. 7603-7604.
50. Goeres A., Sedlmayr E. On the nucleation mechanism of effective fullerite condensation //Chemical physics letters. – 1991. – T. 184. – №. 4. – C. 310-317.
51. Wakabayashi T., Achiba Y. A model for the C₆₀ and C₇₀ growth mechanism //Chemical physics letters. – 1992. – T. 190. – №. 5. – C. 465-468.
52. Achiba Y., Wakabayashi, T., Moriwaki, T., et al. A hypothetical growth mechanism of carbon five-and six-membered ring networks //Materials Science and Engineering: B. – 1993. – T. 19. – №. 1. – C. 14-17.
53. Лозовик Ю. Е., Попов А. М. Образование и рост углеродных наноструктур—фуллеренов, наночастиц, нанотрубок и конусов //Успехи физических наук. – 1997. – T. 167. – №. 7. – C. 751-774.
54. Andreoni W., Scharf D., Giannozzi P. Low-temperature structures of C₄ and C₁₀ from the Car—Parrinello method: singlet states //Chemical Physics Letters. – 1990. – T. 173. – №. 5-6. – C. 449-455.

55. Zerbetto F. Annealing graphite-like structures. A Monte Carlo-quantum chemical study //Chemical physics. – 1991. – T. 150. – №. 1. – C. 39-45.
56. von Helden G., Hsu M. T., Gotts N., et al. Carbon cluster cations with up to 84 atoms: structures, formation mechanism, and reactivity //The Journal of Physical Chemistry. – 1993. – T. 97. – №. 31. – C. 8182-8192.
57. Von Helden G., Hsu, M. T., Gotts, N. G., et al. Do small fullerenes exist only on the computer? Experimental results on C_{20}^{-} and C_{24}^{+} //Chemical physics letters. – 1993. – T. 204. – №. 1-2. – C. 15-22.
58. Broyer M., Goeres, A., Pellarin, M., et al. Experimental studies on the formation process of C_{60} //Chemical physics letters. – 1992. – T. 198. – №. 1-2. – C. 128-134.
59. Пиотровский Л. Б., Киселев О. И. Фуллерены в биологии //СПб.: Росток. – 2006.
60. Kobayashi K. Structures and electronic properties of endohedral metallofullerenes: theory and experiment / K. Kobayashi, S. Nagase // Endofullerenes. A new family of carbon clusters; eds. T. Akasaka, S. Nagase. – Dordrecht – Boston - London: Kluwer Academic Publ., 2002. - P. 99-119.
61. Shinohara, H. Endohedral metallofullerenes / H. Shinohara // Rep. Prog. Phys. – 2000. – V. 63. – P. 843-892.
62. Popov, A. A. Endohedral Fullerenes / A. A. Popov, S. Yang, L. Dunsch //Chem.Rev. – 2013. – V. 113. – P.5989-6113.
63. Lu, X. Carbide Cluster Metallofullerenes: Structure, Properties, and Possible Origin / X. Lu, T. Akasaka, S. Nagase // Acc. Chem. Res. - 2013. - V. – 46. - No.7. – P.1627-1635.
64. Lu, X. Recent progress in the chemistry of endohedral metallofullerenes / X. Lu, L. Bao, T. Akasaka, S. Nagase // Chem. Commun. – 2014. – V. 50. – P. 14701-14715.195
65. Jin, P. Carbon atoms trapped in cages: Metal carbide clusterfullerenes / P. Jin, C. Tang, Z. Chen // Coord. Chem. Rev. – 2014. – V. 270-271. – P. 89-111.
66. Liu, S. Recent progress in the studies of endohedral metallofullerenes / S. Liu, S. Sun // J. Organometal. Chem. – 2000. – V. 599. – P. 74-86.
67. Hirsch, A. The chemistry of the fullerenes / A. Hirsch. - Stuttgart; New York: Thieme, 1994. – 215 p.
68. Hirsch, A. Principles of fullerene reactivity // Topics. Curr. Chem. – 1996. – V. 199. – P. 1-65.

69. Якубке Х. Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки //Пер. с немец. М.: Изд-во «Мир». – 1985.
70. Грачева И. М., Гаврилова Н. Н., Иванова Л. А. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и жиров. – М.: Изд-во «Пищевая промышленность». – 1980.
71. Сазыкин О. Ю. Биотехнология /Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред //АВ Катлинского. –М: Изд-во «Академия». – 2008.
72. Гринштейн Д. Виноц М //Химия аминокислот и пептидов. М.: Мир. – 1965.
73. Shoemaker D. P., Donohue J., Schomaker V., Corey R. B. The crystal structure of L-threonine / J. Amer. Chem. Soc. – 1950. – Vol. 72. – P. 2328– 2349.
74. Гурская Г. В. Структуры аминокислот. – М.: Изд-во «Наука». – 1966.
75. Teas H. J., Horowitz N. H., Fling M, J. Homoserine as a precursor of threonine and methionine in Neurospora //Journal of Biological Chemistry. – 1948. – Т. 172. – С. 651-658.
76. Fling M., Horowitz N. H. Threonine and homoserine in extracts of methionineless mutant of neurospora //Journal of Biological Chemistry. – 1951. – Т. 190. – №. 1. – С. 277-285.
77. Lowenstein J. M., Cohen P. P. Studies on the biosynthesis of carbamylaspartic acid //Journal of Biological Chemistry. – 1956. – Т. 220. – №. 1. – С. 57-70.
78. Ehrensverd G., Reio, L., Saluste, E., et al. Acetic acid metabolism in Torulopsis utilis III. Metabolic connection between acetic acid and various amino acids //Journal of Biological Chemistry. – 1951. – Т. 189. – №. 1. – С. 93-108.
79. Cohen G. N., Hirsch M. L. Threonine synthase, a system synthesizing L-threonine from L-homoserine //Journal of bacteriology. – 1954. – Т. 67. – №. 2. – С. 182.
80. Nisman B., Cohen, G. N., Wiesendanger, S. B., et al. Transformation of aspartic acid into homoserine and threonine by extracts of Escherichia coli //Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. – 1954. – Т. 238. – №. 12. – С. 1342-1344.
81. Black S., Wright N. G. β -Aspartokinase and β -aspartyl phosphate //Journal of Biological Chemistry. – 1955. – Т. 213. – №. 1. – С. 27-38.
82. Black S., Wright N. G. Aspartic β -semialdehyde dehydrogenase and aspartic β -semialdehyde //Journal of Biological Chemistry. – 1955. – Т. 213. – №. 1. – С. 39-50.

83. Black S., Gray N. M. Enzymatic phosphorylation of L-aspartate //Journal of the American Chemical Society. – 1953. – Т. 75. – №. 9. – С. 2271-2272.
84. Black S., Wright N. G. Homoserine dehydrogenase //Journal of Biological Chemistry. – 1955. – Т. 213. – №. 1. – С. 51-60.
85. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия //М.: Медицина. – 2004. – Т. 704.
86. Дэгли С. Метаболические пути / С. Дэгли, Д. Никольсон. – М.: Мир, 1973.
87. Bird M. I., Nunn P. B. Measurement of L-threonine aldolase activity in rat liver// Biochemical Society Transactions. – 1979. – Т. 7 – № 6. – С. 1274-1276.
88. Bird M. I., Nunn P. B. Metabolic homeostasis of L-threonine in the normally-fed rat. Importance of liver threonine dehydrogenase activity //Biochemical Journal. – 1983. – Т. 214. – №. 3. – С. 687-694.
89. Малиновский А. В. Является ли треонин незаменимой аминокислотой? //Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология. – 2011. – №. 1.
90. Edgar A. J. The human L-threonine-3-dehydrogenase gene is an expressed pseudogene /A. J. Edgar // BMC Biochem. – 2002. – Vol. 18, № 3.
91. Sijbesma R., Srdanov G., Wudl F., et al. Synthesis of a fullerene derivative for the inhibition of HIV enzymes //Journal of the American Chemical Society. – 1993. – Т. 115. – №. 15. – С. 6510-6512.
92. Friedman S. H., Schinazi R. F., Wudl F., Hill C. L., De Camp D. L., Sijbesma R. P., Kenyon G. L. Water soluble fullerenes with antiviral activity : US Patent 6204391, March 20, 2001
93. Zhu Z., Schuster D. I., Tuckerman M. E. Molecular dynamics study of the connection between flap closing and binding of fullerene-based inhibitors of the HIV-1 protease //Biochemistry. – 2003. – Т. 42. – №. 5. – С. 1326-1333.
94. Schinazi, R. F., McMillan, A., Juodawlkis, A. S., et al. Anti-human immunodeficiency virus, toxicity in cell culture, and tolerance in mammals of a water-soluble fullerene //Recent advances in the chemistry and physics of fullerenes and related materials. The Electrochemical Society, Pennington, NJ. – 1994. – С. 689-696.
95. Friedman S. H., Ganapathi P. S., Rubin Y., et al. Optimizing the Binding of Fullerene Inhibitors of the HIV-1 Protease through Predicted Increases in Hydrophobic Desolvation//Journal of medicinal chemistry. – 1998. – Т. 41. – №. 13. – С. 2424-2429.

96. Kim J. E., Lee M. Fullerene inhibits β -amyloid peptide aggregation //Biochemical and biophysical research communications. – 2003. – Т. 303. – №. 2. – С. 576-579.
97. Wang I. C., Tai L. A., Lee D. D. et al. C₆₀ and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation //Journal of medicinal chemistry. – 1999. – Т. 42. – №. 22. – С. 4614-4620.
98. Moussa F., Pressac M., Hadchouel M., et al. C₆₀ fullerene toxicity: preliminary account of an in vivo study //Fullerenes. – 1997. – Т. 97. – №. 42. – С. 332-336.
99. Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M., et al. [60] fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity //Nano Letters. – 2005. – Т. 5. – №. 12. – С. 2578-2585.
100. Käsermann F., Kempf C. Photodynamic inactivation of enveloped viruses by buckminsterfullerene //Antiviral research. – 1997. – Т. 34. – №. 1. – С. 65-70.
101. Käsermann F., Kempf C. Buckminsterfullerene and photodynamic inactivation of viruses //Reviews in Medical Virology. – 1998. – Т. 8. – №. 3. – С. 143-151.
102. Растворимость легких фуллеренов в органических растворителях : диссертация ... кандидата химических наук : 02.00.04 / Семенов Константин Николаевич; [Место защиты: С.-Петербург. гос. ун-т] Количество страниц: 174 с. ил. 61 10-2/337.
103. Yamakoshi Y., Umezawa N., Ryu A., et al. Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C₆₀) as potential medicines: O₂-• versus ¹O₂ //Journal of the American Chemical Society. – 2003. – Т. 125. – №. 42. – С. 12803-12809.
104. Ikeda A., Iizuka T., Maekubo N., et al. Cyclodextrin complexed [60] fullerene derivatives with high levels of photodynamic activity by long wavelength excitation //ACS medicinal chemistry letters. – 2013. – Т. 4. – №. 8. – С. 752-756.
105. Ikeda A., Doi Y., Nishiguchi K., et al. Induction of cell death by photodynamic therapy with water-soluble lipid-membrane-incorporated [60] fullerene //Organic & biomolecular chemistry. – 2007. – Т. 5. – №. 8. – С. 1158-1160.
106. Komatsu T., Nakagawa A., Qu X. Structural and mutagenic approach to create human serum albumin-based oxygen carrier and photosensitizer //Drug metabolism and pharmacokinetics. – 2009. – Т. 24. – №. 4. – С. 287-299.
107. Bogdanović V., Stankov K., Icević I., et al. Fullerenol C₆₀ (OH)₂₄ effects on antioxidative enzymes activity in irradiated human erythroleukemia cell line //Journal of radiation research. – 2008. – Т. 49. – №. 3. – С. 321-327.

108. Irie K., Nakamura Y., Ohigashi H., et al. Photocytotoxicity of water-soluble fullerene derivatives // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 1996. – Т. 60. – №. 8. – С. 1359-1361.
109. Корнев А.Б., Трошин П.А., Трошина О.А. Биологически активные производные фуллеренов, методы их получения и применение в медицине // *Органические и гибридные наноматериалы: тенденции и перспективы* / ed. Ключев М.В., Разумов В.Ф. Иваново: Иван. гос. ун-т., 2013. Р. 392–502.
110. Bullard-Dillard R., Creek K.E., Scrivens W.A., Tour J.M. Tissue Sites of Uptake of ^{14}C -Labeled C_{60} // *Bioorg. Chem.* 1996. Vol. 24, № 4. P. 376–385.
111. Kubota R., Tahara M., Shimizu K., et al. Time-dependent variation in the biodistribution of C_{60} in rats determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // *Toxicol. Lett.* 2011. Vol. 206, № 2. P. 172–177.
112. Cagle D.W., Kennel S.J., Mirzadeh S., et al. In vivo studies of fullerene-based materials using endohedral metallofullerene radiotracers // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999. Vol. 96, № 9. P. 5182–5187.
113. К.Н.Семенов. Синтез и идентификация фуллеренола, полученного методом прямого окисления / К.Н.Семенов, Д.Г.Летенко, Н.А.Чарыков и др. // *Журн. Прикл. Хим.* 2010. Т.83. N12. С.1948-1952.
114. Chiang, L. Y. Versatile nitronium chemistry for C_{60} fullerene functionanlization /. L. Y. Chiang, R. B. Upasani, J. W. Seirczewshi // *J. W. J. Am. Chem. Soc.* – 1992. – V. 114. – P. 10154-10157.
115. Chiang L. Y., Swirczewski J. W., Hsu S. Synthesis of Fullerols from an Aqueous Acid Method // *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* – 1992. –V. 270. – P. 247. – 285.
116. Chiang L. Y., Swirczewski J. W., Hsu S., et al. Multi-hydroxy additions onto C_{60} fullerene molecules // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*– 1992. – P. 1791-1793
117. Sun D. Y., Liu Z. Y., Guo X. H., et al. Convenient Preparation and Properties of $\text{C}_{60}(\text{OH})_x$ // *Chem. J. Chin. Univ.* – 1996. – V. 17, № 1. – P. 17-19.
118. Li J., Takeuchi A., Ozawa M., et al. C_{60} fullerol formation catalysed by quaternary ammonium hydroxides // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* – 1993. – P. 1784-1785.
119. Husebo L. O., Sitharaman B., Furukawa K., et al. Fullerenols Revisited as Stable Radical Anions// *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – V.126, N.38. – P. 12055-12064.

120. Zhang J.-M., Yang W., Ping H., et al. Efficient and Convenient Preparation of Water-Soluble Fullerenol // Chinese Journal of Chemistry. – 2004. – V. 22. – P. 1008-1011.
121. Bogdanovi G., Koji V., Pordevi A., et al. Modulating activity of fullerol C₆₀(OH)₂₂ on doxorubicin-induced cytotoxicity // Balti – 2004.
122. Chiang, L. Y., Bhonsle J. B., Wang S. P. et al. Efficient one-flask synthesis of water-soluble [60]fullerenols // Tetrahedron. – 1996. – V. 52. – P. 4963-4972.
123. Chiang, L. Y., Upasani R. B., Swirczewski J. W., et al. Evidence of Hemiketals Incorporated in the Structure of Fullerenols Derived from Aqueous Acid Chemistry // J. Am. Chem. Soc. – 1993. – V. 115 – P. 5453-5457.
124. Da Rocha A. M., Ferreira J. R., Barros D. M., et al. Gene expression and biochemical responses in brain of zebrafish *Danio rerio* exposed to organic nanomaterials: carbon nanotubes (SWCNT) and fullerol (C₆₀(OH)₁₈₋₂₂(OK₄) // Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular and Integrative Physiology. – 2013. – V. 165, № 4. – P. 460-467.
125. Xu, J.-Y., Su Y.-Y., Cheng J.-S. et al. Protective effects of fullerol on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats// Carbon. – 2010. – V. 48, № 5. – P. 1388-1396.
126. Jiao F., Liu Y., Qu Y., et al. Studies on anti-tumor and antimetastatic activities of fullerol in a mouse breast cancer model// Carbon. – 2010. – V. 48, №8 – P. 2231-2243.
127. Chen Y. W., Hwang K. C., Yen C. C., Lai Y. L. Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemia-reperfused lungs // Am. J Physiol. – 2004. – V. 287, №1. – P. R21-R26.
128. Taylor E. Fullerene derivatives protect against oxidative stress in murine macrophage line cells and ischemia-reperfused lungs // Am. J. Physiol. – 2004. – V. 287, №1. – P. R1-R2.
129. Djordjevic A., Canadanovic-Brunet J., VojinovicMiloradov M., et al. Antioxidant properties and hypothetical radical mechanism of fullerol C₆₀(OH)₂₄ // Oxid Commun. – 2005. – V. 27, № 4. – P. 806-12.
130. Torres V. M., Srdjenovic B., Jacevic V., et al. Fullerol C₆₀(OH)₂₄ prevents doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rats //Pharmacol Rep. – 2010. – V. 62, № 4. – P. 707-718.

131. Injac R., Radic N., Govedarica B., et al. Acute doxorubicin pulmototoxicity in rats with malignant neoplasm is effectively treated with fulleranol C₆₀(OH)₂₄ through inhibition of oxidative stress // *Pharmacological Reports*. – 2009. – V. 61, № 2. – P. 335-342.
132. Chaudhuri P., Paraskar A., Soni S. et al. Fulleranol–Cytotoxic Conjugates for Cancer Chemotherapy /P. Chaudhuri, // *ACS Nano*. – 2009. – V.3, № 9. – P. 2505–2514.
133. Aoshima H., Kokubo K., Shirakawa Sh., et al. Antimicrobial activity of fullerenes and their hydroxylated derivatives // *Biocontrol science*. – 2009. – V.14, № 2. – P. 69-72.
134. Ryan J.J, Bateman H.R., Stover A., et al. Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response / J.J. Ryan, // *J Immunol*. – 2007. – V. 179, № 1. – P. 665-72.
135. Bowler R. P., Crapo J. D. Oxidative stress in allergic respiratory diseases // *J. Allergy Clin. Immunol*. – 2002. – V. 110. – P. 349-356.
136. Yang X. L., Fan C. H., Zhu H. S. Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C₆₀] fullerene derivatives and its mechanism // *Toxicology in vitro*. – 2002. – T. 16. – №. 1. – C. 41-46.
137. Пиотровский Л. Б., Кузнецов В. Б. Фуллерены: фотодинамические процессы и новые подходы к медицине //СПб.: Роза мира. – 2005.
138. Kotelnikova R. A., Kotelnikov A. I., Bogdanov G. N., Romanova V. S., Kuleshova E. F., Parnes Z. N., Vol'pin M. E. Membranotropic properties of the water soluble amino acid and peptide derivatives of fullerene C₆₀ // *FEBS Letters*. 1996. V. 389. P. 111-114.
139. Andreev I., Romanova, V. S., Petrukhina, A. et al. Amino-acid derivatives of fullerene C₆₀ behave as lipophilic ions penetrating through biomembranes // *Physics of the Solid State*. – 2002. – T. 44. – №. 4. – C. 683-685.
140. Jiang G., Yin F., Duan J., Li G. Synthesis and properties of novel water-soluble fullerene–glycine derivatives as new materials for cancer therapy // *J. Mater. Sci: Mater. Med*. 2015. V. 26. P. 1-7
141. Hu Z., Zhang C., Huang Y. et al. Photodynamic anticancer activities of water-soluble C₆₀ derivatives and their biological consequences in a HeLa cell line // *Chemico-biological interactions*. – 2012. – T. 195. – №. 1. – C. 86-94.
142. Kumar A., Rao M. V., Menon S. K. Photoinduced DNA cleavage by fullerene-lysine conjugate // *Tetrahedron Lett*. 2009. V. 50. P. 6526–6530.
143. Hu Z., Guan W., Wang W., Huang L., Tang X., Xu H., Zhu Z., Xie X., Xing H. Synthesis of amphiphilic amino acid C₆₀ derivatives and their protective effect on hydrogen

- peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells // Carbon. 2008. V. 46. P. 99–109.
144. Grigoriev V. V., Petrova L. N., Ivanova T. A., Kotel'nikova R. A., Bogdanov G. N., Poletayeva D. A., Faingold I. I., Mishchenko D. V., Romanova V. S., Kotel'nikov A. I., Bachurin S. O. Study of the neuroprotective action of hybrid structures based on fullerene C60 // Biology Bull. 2011. V. 38. P. 125–131.
145. Tat'yanenko L. V., Dobrokhotova O. V., Kotel'nikova R. A., Poletayeva D. A., Mishchenko D. V., Pikhteleva I. Yu., Bogdanov G. N., Romanova V. S., Kotel'nikov A. I. Effect of nitroxyalkyl derivatives of fullerenylproline on the activity of Ca³⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum // Pharm. Chem. J. 2011. V. 45. P. 329-332.
146. Kotel'nikova R. A., Faingol'd I. I., Poletaeva D. A., Mishchenko D. V., Romanova V. S., Shtol'ko V. N., Bogdanov G. N., Rybkin A. Yu., Frog E. S., Smolina A. V., Kushch A. A., Fedorova N. E., Kotel'nikov A. I. Antioxidant properties of water-soluble amino acid derivatives of fullerenes and their role in the inhibition of herpes virus infection // Rus. Chem. Bull. 2011. V. 6. P. 1172-1176
147. Фалынская И.Н., Ионова К.С., Дедова А.В., Ленева И.А., Махмудова Н.Р., Раснецов Л.Д. Противовирусное действие гидрата фуллерен(трис-аминокапроновой кислоты) в культуре клеток HEp-2 в отношении респираторно-синцитиального вируса // Химико-фармацевтический журнал.- 2014. - №2. - С.17-20
148. Huang Z. R., Hua S. C., Yang Y. L., Fang, J. Y. Development and evaluation of lipid nanoparticles for camptothecin delivery: a comparison of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, and lipid emulsion // Acta Pharmacologica Sinica. – 2008. – T. 29. – №. 9. – С. 1094-1102.